

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

10 August 1998 (10.08.98)

International application No.

PCT/EP97/07306

Applicant's or agent's file reference

Le A 32 145-PC

International filing date (day/month/year)

24 December 1997 (24.12.97)

Priority date (day/month/year)

08 January 1997 (08.01.97)

Applicant

DÜRR, Hansjörg et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

16 July 1998 (16.07.98)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election



was



was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Jocelyne Rey-Millet

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT



(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts Le A 32 145-PC Bu	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP97/07306	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 24/12/1997	Priority date (Tag/Monat/Jahr) 08/01/1997
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C07H1/08		
Anmelder BAYER AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
- ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).
- Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 16/07/1998	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 02.01.99
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Bevollmächtigter Bediensteter Komenda, P Telefon (+49-89) 2399-2777 

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP97/07306

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-31 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-12 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/5-5/5 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-5,7-12
	Nein: Ansprüche	6
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-5,9-12
	Nein: Ansprüche	6,7
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-12
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

Abschnitt V:

N:

- 1) Das Dokument **D1 = BIOMAT., MED. DEVICES, ARTIF. ORGANS (1982), 10(3), 187-203**, zeigt eine Vorrichtung in Form eines Chip-Moduls (vgl. Figur 1) mit eingebetteter Membran, wobei 1-400 Kapillaren nebeneinander angeordnet sind ("10 etched microchannel conduits"). Damit sind alle technischen Merkmale des vorliegenden Anspruchs 6 bereits aus D1 bekannt (Artikel 33(2) PCT). Die Vorrichtung aus D1 wird zwar im Durchfluß betrieben, jedoch sind in Anspruch 6 keine Mittel zur Durchführung der "Elektrokinetik" angegeben.
- 2) Das nächstliegende Dokument des internationalen Recherchenberichts bezüglich der Verfahrensansprüche 1-5 ist die **WO 93/05390**, die ein kapillarelektrophoretisches Analysenverfahren beschreibt, bei dem in einem Kapillarzweischstück, in dem sich chemisch beschichtete Glasperlen befinden, gewünschte Makromoleküle angesammelt werden. Das Verfahren nach Anspruch 1 unterscheidet sich davon, daß zur Sammlung von gewünschten Makromolekülen eine Membran verwendet wird, welche in einem Mikrokanal angeordnet ist (Artikel 33(2) PCT).

Dieses unterscheidende Merkmal findet sich auch in den abhängigen Ansprüchen 2-5 sowie in den Verwendungsansprüchen (Artikel 33(2) PCT).

ET:

- 1) Die abhängigen Ansprüche 7 und 8 scheinen Gegenstände zu betreffen, die im Rahmen fachmännischen Handelns liegen (Artikel 33(3) PCT).
- 2) Das Dokument D1 des internationalen Recherchenberichts beschäftigt sich mit der Adsorption von Proteinen an Membranen die mit Kohlenstoff beschichtet sind. Zur Untersuchung der Membranen wird eine Vorrichtung verwendet, welche Mikrokanäle besitzt, durch die die Proteinlösung gepumpt wird, und auf die zu untersuchende Membran trifft. Das Ziel der Beschichtung der Membranen in diesem Dokument ist gerade die Ansammlung der Proteine zu vermeiden. Daher

ist dieses Dokument nicht dazu geeignet, die erfinderische Tätigkeit der
Verfahrens- und Verwendungsansprüche in Frage zu stellen (Artikel 33(3) PCT).

IA: Die industrielle Anwendbarkeit ist gegeben (Artikel 33(4) PCT).

Abschnitt VIII:

- 1) Vorrichtungsanspruch 7 muß auf Anspruch 6 rückbezogen werden, da es sich bei
Anspruch 2 um einen Verfahrensanspruch handelt.

VEREINBAR ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

09/34/227

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Le A 32 145-PC		
Internationales Aktenzeichen	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
PCT/EP 97/07306	24/12/1997	08/01/1997
Anmelder		
BAYER AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 2 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nichtrecherchierbar erwiesen (siehe Feld I).
2. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).
3. ☐ In der internationalen Anmeldung ist ein Protokoll einer Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz offenbart; die internationale Recherche wurde auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt,
 - ☐ das zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht wurde.
 - ☐ das vom Anmelder getrennt von der internationalen Anmeldung vorgelegt wurde,
 - ☐ dem jedoch keine Erklärung beigelegt war, daß der Inhalt des Protokolls nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung hinausgeht.
 - ☐ das von der Internationalen Recherchenbehörde in die ordnungsgemäße Form übertragen wurde.
4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**
 - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
 - ☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt.
5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**
 - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
 - ☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der Feld III angegebenen Fassung von dieser Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Internationalen Recherchenbehörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.
6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen:
Abb. Nr.
 - ☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen
 - ☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
 - ☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C07H1/08 G01N33/50

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07H G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
------------------------	--	--------------------

A	WO 93 05390 A (GUZMAN NORBERTO A) 18.März 1993 in der Anmeldung erwähnt Ganzes Dokument; insbesondere Seite 2 Absatz 2 und Abbildung 31.	1,6
---	---	-----

A	BOROVETZ, HARVEY S. ET AL: "Protein adsorption in vitro onto biomaterial surfaces covered with ULTI carbon" BIOMATER., MED. DEVICES, ARTIF. ORGANS (1982), 10(3), 187-203 CODEN: BMDOAI; ISSN: 0090-5488, 1982, XP002060277 See abstract.	6
---	--	---

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

7. April 1998

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

24/04/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Riolo, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/07306

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9305390 A	18-03-93	US 5202010 A	13-04-93
		AU 661241 B	13-07-95
		AU 2640192 A	05-04-93
		CA 2120251 A	18-03-93
		EP 0666980 A	16-08-95
		MX 9204974 A	31-05-94

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference Le A 32 145-PC	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP97/07306	International filing date (day/month/year) 24 December 1997 (24.12.1997)	Priority date (day/month/year) 08 January 1997 (08.01.1997)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07H 1/08		
Applicant BAYER AKTIENGESELLSCHAFT		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 16 July 1998 (16.07.1998)	Date of completion of this report 02 February 1999 (02.02.1999)
Name and mailing address of the IPEA/EP European Patent Office D-80298 Munich, Germany Facsimile No. 49-89-2399-4465	Authorized officer Komenda, P Telephone No. 49-89-2399-0

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP97/07306

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.):

☐ the international application as originally filed.

☒ the description, pages 1-31, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages _____, filed with the letter of _____,
pages _____, filed with the letter of _____.

☒ the claims, Nos. 1-12, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. _____, filed with the letter of _____,
Nos. _____, filed with the letter of _____.

☒ the drawings, sheets/fig 1/5-5/5, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages _____

☐ the claims, Nos. _____

☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 97/07306

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-5, 7-12	YES
	Claims	6	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-5, 9-12	YES
	Claims	6, 7	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Novelty

1. **BIOMAT., MED. DEVICES, ARTIF. ORGANS (1982), 10(3), 187-203 (D1)** shows a device in the form of a chip module (cf. Figure 1) with an embedded membrane, wherein 1-400 capillaries are adjacent ("10 etched microchannel conduits"). Consequently, D1 already discloses all the technical features of present Claim 6 (PCT Article 33(2)). Although the device in D1 operates according to the flow-through principle, Claim 6 does not outline any means for performing "electrokinetics".
2. The closest international search report citation with respect to method Claims 1-5 is **WO 93/05390**. It describes a capillary electrophoresis method of analysis in which desired macromolecules accumulate in an intermediate capillary part in which there are glass beads coated by chemical means. The method as per Claim 1 differs from the above in that a membrane is used to collect desired macromolecules and is arranged in a microchannel (PCT Article 33(2)).

This distinguishing feature can also be found in dependent Claims 2-5 and the use claims (PCT Article 33(2)).

Inventive step

1. Dependent Claims 7 and 8 appear to relate to subjects which are routine trade practice (PCT Article 33(3)).
2. The international search report citation D1 relates to the adsorption of proteins onto membranes coated with carbon. A device is used to examine the membranes, which has microchannels through which the protein solution is pumped and hits the membrane to be examined. In this document the reason the membranes are coated is to avoid protein accumulation. Consequently, this document is not suitable for questioning the inventive step of the method and use claims (PCT Article 33(3)).

Industrial applicability

Industrial applicability is established (PCT Article 33(4)).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 97/07306

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. Device Claim 7 has to refer back to Claim 6 since Claim 2 is a method claim.

PCT

ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

NEUANMELDUNG

Internationales Anmeldedatum

02.01.98

Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)
(max. 12 Zeichen) Le A 32 145-PC Bu

Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG
"Elektrokinetische Probenvorbereitung".

Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT
51368 Leverkusen,
DE

☐ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:

0214 30 71166

Telefaxnr.:

0214 30 34 82

Fernschreibnr.:

85 101-265byd

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐

alle Bestimmungsstaaten

☒

alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐

nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐

die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Dürr, Hansjörg
Luisenstr. 23a
D-51399 Burscheid
DE

123 Buckden Place
Cary
N.C. 27511, USA

Diese Person ist:

☐

nur Anmelder

☒

Anmelder und Erfinder

☐

nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐

alle Bestimmungsstaaten

☐

alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒

nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐

die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☒ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als: ☐ Anwalt ☒ gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT
51368 Leverkusen, DE

Telefonnr.:

0214 30 71166

Telefaxnr.:

0214 30 34 82

Fernschreibnr.:

85 101-265byd

☐ Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER			
<i>Wird keines der folgenden Felder benutzt, so ist dieses Blatt dem Antrag nicht beizufügen.</i>			
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.) Brüggemeier, Ulf 20 Apple Way Madison, Connecticut 06443 US		Diese Person ist: <input type="checkbox"/> nur Anmelder <input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder <input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)	
Staatsangehörigkeit (Staat): DE		Sitz oder Wohnsitz (Staat): US	
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten			
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.) Dierksen, Karsten Neunkircher Str. 16 D 51107 Köln DE		Diese Person ist: <input type="checkbox"/> nur Anmelder <input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder <input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)	
Staatsangehörigkeit (Staat): DE		Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten			
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.) Hehnen, Hans-Robert Am Trerichsweiher 19 D 53721 Siegburg DE		Diese Person ist: <input type="checkbox"/> nur Anmelder <input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder <input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)	
Staatsangehörigkeit (Staat): DE		Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten			
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.) Neumann, Rainer Olefstr. 11 D 50937 Köln DE		Diese Person ist: <input type="checkbox"/> nur Anmelder <input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder <input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)	
Staatsangehörigkeit (Staat): DE		Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten			

☒ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.

Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Wird keines der folgenden Felder benutzt, so ist dieses Blatt dem Antrag nicht beizufügen.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Kuckert, Eberhard
Am Scherfenbrand 67
D 51375 Leverkusen
DE

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder☒ Anmelder und Erfinder☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

☐ nur Anmeider☐ Anmelder und Erfinder☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder☐ Anmelder und Erfinder☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder☐ Anmelder und Erfinder☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent

- ☒ **ÄP ARIPO-Patent:** GH Ghana, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swasiland, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☒ **EA Eurasisches Patent:** AM Armenien, AZ Aserbaidschan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ **EP Europäisches Patent:** AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ **OA OAPI-Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

- | | |
|--|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albanien | <input checked="" type="checkbox"/> LV Lettland |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Armenien | <input checked="" type="checkbox"/> MD Republik Moldau |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Österreich | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagaskar |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australien | <input checked="" type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Aserbaidschan | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolei |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexiko |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgarien | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norwegen |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brasilien | <input checked="" type="checkbox"/> NZ Neuseeland |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> PL Polen |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> RO Rumänien |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russische Föderation |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Kuba | <input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik | <input checked="" type="checkbox"/> SE Schweden |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE Deutschland | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapur |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Dänemark | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slowenien |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estland | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slowakei |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spanien | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finnland | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tadschikistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgien | <input checked="" type="checkbox"/> TR Türkei |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Ungarn | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Island | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Usbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenia | <input checked="" type="checkbox"/> VN Vietnam |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG Kirgisistan | <input checked="" type="checkbox"/> YU Jugoslawien |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Simbabwe |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republik Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kasachstan | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LT Litauen | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxemburg | |

Kästchen für die Bestimmung von Staaten (für die Zwecke eines nationalen Patents), die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind:

☒ und alle diejenigen Länder, die am Anmeldetag dem PCT beigetreten sind, wie:

☒ ID Indonesien

☐

☐

Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der Bestimmung von

Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)

Zusatzfeld Wird dieses Zusatzfeld nicht benutzt, so ist dieses Blatt dem Antrag nicht beizufügen.

Dieses Feld ist in folgenden Fällen auszufüllen:

1. Wenn der Platz in einem Feld nicht für alle Angaben ausreicht:

In diesem Fall sind mit dem Vermerk "Fortsetzung von Feld Nr. ..." [Nummer des Feldes angeben] die gleichen Angaben zu machen wie in dem Feld vorgesehen, das platzmäßig nicht ausreicht;

insbesondere:

i) Wenn mehr als drei Anmelder und/oder Erfinder vorhanden sind und kein Fortsetzungsblatt zur Verfügung steht:

In diesem Fall sind mit dem Vermerk "Fortsetzung von Feld Nr. III" für jede weitere Person die in Feld Nr. III vorgesehenen Angaben zu machen.

ii) Wenn in Feld Nr. II oder III die Angabe "die im Zusatzfeld angegebenen Staaten" angekreuzt ist:

In diesem Fall sind mit dem Vermerk "Fortsetzung von Feld Nr. II", "Fortsetzung von Feld Nr. III" oder "Fortsetzung von Feld Nr. II und Nr. III" die Namen der Anmelder und neben jedem Namen der Staat oder die Staaten (und/oder ggf. Europäisches oder OAPI-Patent) anzugeben, für die die bezeichnete Person Anmelder ist.

iii) Wenn der in Feld Nr. II oder III genannte Erfinder oder Erfinder/Anmelder nicht für alle Bestimmungsstaaten oder für die Vereinigten Staaten von Amerika als Erfinder benannt ist:

In diesem Fall sind mit dem Vermerk "Fortsetzung von Feld Nr. II" oder "Fortsetzung von Feld Nr. III" oder "Fortsetzung von Feld Nr. II und Nr. III" der Name des Erfinders und neben jedem Namen der Staat oder die Staaten (und/oder ggf. Europäisches oder OAPI-Patent) anzugeben, für die die bezeichnete Person Erfinder ist.

iv) Wenn zusätzlich zu dem Anwalt/den Anwälten, die in Feld Nr. IV angegeben sind, weitere Anwälte bestellt sind:

In diesem Fall sind mit dem Vermerk "Fortsetzung von Feld Nr. IV" für jeden weiteren Anwalt die gleichen Angaben zu machen wie in Feld Nr. IV vorgesehen.

v) Wenn in Feld Nr. V bei einem Staat (oder bei OAPI) die Angabe "Zusatzpatent", "Zusatzzertifikat" oder "Zusatzerfinderschein" oder wenn in Feld Nr. V bei den Vereinigten Staaten von Amerika die Angabe "Fortsetzung" oder "Teilfortsetzung" hinzugefügt wird:

In diesem Fall sind mit dem Vermerk "Fortsetzung von Feld Nr. V" die Namen der betreffenden Staaten (oder OAPI) und nach dem Namen jeder dieser Staaten (oder OAPI) das Aktenzeichen des Hauptschutzrechts oder der Hauptschutzrechtsanmeldung und das Datum der Erteilung des Hauptschutzrechts oder der Einreichung der Hauptschutzrechtsanmeldung anzugeben.

vi) Wenn die Priorität von mehr als drei früheren Anmeldungen beansprucht wird:

In diesem Fall sind mit dem Vermerk "Fortsetzung von Feld Nr. VI" für jede weitere frühere Anmeldung die gleichen Angaben zu machen wie in Feld Nr. VI vorgesehen.

2. Wenn der Anmelder für irgendein Bestimmungsamt die Vergünstigung nationaler Vorschriften betreffend unschädliche Offenbarung oder Ausnahmen von der Neuheitsschädlichkeit in Anspruch nimmt:

In diesem Fall ist mit dem Vermerk "Erklärung betreffend unschädliche Offenbarung oder Ausnahmen von der Neuheitsschädlichkeit" nachstehend diese Erklärung abzugeben.

Fortsetzung von Feld Nr. IX.

1) Hansjörg Dürr
Hansjörg Dürr

2) Ulf Brügge
Ulf Brügge

3) Karsten Dierksen
Karsten Dierksen

4) Hans-Robert Hehnen
Hans-Robert Hehnen

5) Rainer Neumann
Rainer Neumann

6) Eberhard Kuckert
Eberhard Kuckert

Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCH Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben. ☐

Die Priorität der folgenden früheren Anmeldung(en) wird hiermit beansprucht:

Staat (Anmelde- oder Bestimmungsstaat der Anmeldung)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen	Anmeldeamt (nur bei regionaler oder internationaler Anmeldung)
(1) DE	(08.01.97) 8. Januar 1997	197 00 364.8	
(2)			
(3)			

Dieses Kästchen ankreuzen, wenn die beglaubigte Kopie der früheren Anmeldung von dem Amt ausgestellt werden soll, das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist (eine Gebühr kann verlangt werden):

☐ Das Anmeldeamt wird hiermit ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in Zeile(n) _____ bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem Internationalen Büro zu übermitteln.

Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE
Wahl der Internationalen Recherchenbehörde (ISA) (Sind zwei oder mehr Internationale Recherchenbehörden für die internationale Recherche zuständig, ist der Name der Behörde anzugeben, die die internationale Recherche durchführen soll; Zweibuchstaben-Code genügt):

ISA / _____

Frühere Recherche: Auszufüllen, wenn eine Recherche (internationale Recherche, Recherche internationaler Art oder sonstige Recherche) bereits bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist und diese Behörde nun ersucht wird, die internationale Recherche soweit wie möglich auf die Ergebnisse einer solchen früheren Recherche zu stützen. Die Recherche oder der Recherchenantrag ist durch Angabe der betreffenden Anmeldung (bzw. deren Übersetzung) oder des Recherchenantrags zu bezeichnen.

Staat (oder regionales Amt):

Datum (Tag/Monat/Jahr):

Aktenzeichen:

Feld Nr. VIII KONTROLLISTE

Diese internationale Anmeldung umfaßt:

1. Antrag : 6 Blätter
 2. Beschreibung : 31 Blätter
 3. Ansprüche : 2 Blätter
 4. Zusammenfassung : 1 Blätter
 5. Zeichnungen : 8 Blätter
 Insgesamt : 48 Blätter

Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

1. ☐ Unterzeichnete gesonderte Vollmacht
 2. ☐ Kopie der allgemeinen Vollmacht
 3. ☐ Begründung für das Fehlen der Unterschrift
 4. ☒ Prioritätsbeleg(e) (durch die Zeilennummer von Feld Nr. VI kennzeichnen):
 5. ☒ Blatt für die Gebührenberechnung
 6. ☐ Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen
 7. ☐ Sequenzprotokolle für Nucleotide und/oder Aminosäuren (Diskette)
 8. ☒ Sonstige (einzeln aufführen):
 Druckschriftenbestellung
 Labbuchungsauftrag

Abbildung Nr. _____ der Zeichnungen (falls vorhanden) soll mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden.

Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT

Weitere Unterschriften
s. Blatt 5

Dr. Schauerte

Dr. Burkert

Vom Anmeldeamt auszufüllen

1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:	2. Zeichnungen <input type="checkbox"/> eingegangen: <input type="checkbox"/> nicht eingegangen:
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:	
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:	
5. Vom Anmelder benannte Internationale Recherchenbehörde: ISA /	6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07H1/08 G01N33/50

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C07H G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 93 05390 A (GUZMAN NORBERTO A) 18.März 1993 in der Anmeldung erwähnt Ganzes Dokument; insbesondere Seite 2 Absatz 2 und Abbildung 31. ---	1,6
A	BOROVETZ, HARVEY S. ET AL: "Protein adsorption in vitro onto biomaterial surfaces covered with ULTI carbon" BIOMATER., MED. DEVICES, ARTIF. ORGANS (1982), 10(3), 187-203 CODEN: BMDOAI;ISSN: 0090-5488, 1982, XP002060277 See abstract. -----	6

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

7. April 1998

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

24/04/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Riolo, J

PCT/EP 97/07306

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9305390 A	18-03-93	US 5202010 A	13-04-93
		AU 661241 B	13-07-95
		AU 2640192 A	05-04-93
		CA 2120251 A	18-03-93
		EP 0666980 A	16-08-95
		MX 9204974 A	31-05-94

PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : <p style="text-align: center; font-weight: bold;">C07H 1/08, G01N 33/50</p>	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/30571 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 16. Juli 1998 (16.07.98)		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; border: none; padding: 5px;"> (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/07306 (22) Internationales Anmeldedatum: 24. Dezember 1997 (24.12.97) (30) Prioritätsdaten: 197 00 364.8 8. Januar 1997 (08.01.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-51368 Leverkusen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DÜRR, Hansjörg [DE/DE]; Luisenstrasse 23a, D-51399 Burscheid (DE). BRÜGGEMEIER, Ulf [DE/US]; 20 Apple Way, Madison, CT 06443 (US). DIERKSEN, Karsten [DE/DE]; Neunkircher Strasse 16, D-51107 Köln (DE). HEHNEN, Hans-Robert [DE/DE]; Am Trerichsweiher 19, D-53721 Siegburg (DE). NEUMANN, Rainer [DE/DE]; Olefstrasse 11, D-50937 Köln (DE). KUCKERT, Eberhard [DE/DE]; Am Scherfenbrand 67, D-51375 Leverkusen (DE). (74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT; D-51368 Leverkusen (DE). </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; border: none; padding: 5px;"> (81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> </td> </tr> </table>			(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/07306 (22) Internationales Anmeldedatum: 24. Dezember 1997 (24.12.97) (30) Prioritätsdaten: 197 00 364.8 8. Januar 1997 (08.01.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-51368 Leverkusen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DÜRR, Hansjörg [DE/DE]; Luisenstrasse 23a, D-51399 Burscheid (DE). BRÜGGEMEIER, Ulf [DE/US]; 20 Apple Way, Madison, CT 06443 (US). DIERKSEN, Karsten [DE/DE]; Neunkircher Strasse 16, D-51107 Köln (DE). HEHNEN, Hans-Robert [DE/DE]; Am Trerichsweiher 19, D-53721 Siegburg (DE). NEUMANN, Rainer [DE/DE]; Olefstrasse 11, D-50937 Köln (DE). KUCKERT, Eberhard [DE/DE]; Am Scherfenbrand 67, D-51375 Leverkusen (DE). (74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT; D-51368 Leverkusen (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/07306 (22) Internationales Anmeldedatum: 24. Dezember 1997 (24.12.97) (30) Prioritätsdaten: 197 00 364.8 8. Januar 1997 (08.01.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-51368 Leverkusen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DÜRR, Hansjörg [DE/DE]; Luisenstrasse 23a, D-51399 Burscheid (DE). BRÜGGEMEIER, Ulf [DE/US]; 20 Apple Way, Madison, CT 06443 (US). DIERKSEN, Karsten [DE/DE]; Neunkircher Strasse 16, D-51107 Köln (DE). HEHNEN, Hans-Robert [DE/DE]; Am Trerichsweiher 19, D-53721 Siegburg (DE). NEUMANN, Rainer [DE/DE]; Olefstrasse 11, D-50937 Köln (DE). KUCKERT, Eberhard [DE/DE]; Am Scherfenbrand 67, D-51375 Leverkusen (DE). (74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT; D-51368 Leverkusen (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>			
(54) Title: ELECTROKINETIC SAMPLE PREPARATION (54) Bezeichnung: ELEKTROKINETISCHE PROBENVORBEREITUNG (57) Abstract <p>The invention concerns a method which enables macromolecules (nucleic acids, proteins, viruses and bacteria) to be isolated from biological materials, such as blood, serum, fluid, urine, plants, cells, supernatant liquor from cells, etc. and preparations thereof, concentrated and rendered accessible to analysis. The macromolecules are first electrokinetically concentrated in a flat duct on a membrane. The concentrated macromolecules can be transferred electrokinetically via a transfer duct into an analytical micro-duct for further processing.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren, daß es erlaubt, Makromoleküle (Nukleinsäuren, Proteine, Viren und Bakterien) aus biologischen Materialien, wie Blut, Serum, Liquor, Urin, Pflanzen, Zellen, Zellüberständen etc. und Aufbereitungen daraus, zu isolieren, aufzukonzentrieren und analytisch zugänglich zu machen. Die Makromoleküle werden zunächst in einem Flachkanal an einer Membran elektrokinetisch aufkonzentriert. Die aufkonzentrierten Makromoleküle können elektrokinetisch über einen Transferkanal in einen analytischen Mikrokanal zur weiteren Prozessierung überführt werden.</p>				

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Elektrokinetische Probenvorbereitung

Biologische Makromoleküle wie z.B. Proteine und Nukleinsäuren, aber auch kleine
Teilchen wie Viren und Bakterien sind sowohl diagnostisch, als auch für die medizi-
5 nische Forschung, von großer Bedeutung.

Die etablierten Verfahren zur Charakterisierung dieser Substanzen aus biologischen
Matrizes sind z.T. sehr aufwendig. So wird beispielsweise für Nukleinsäure-Analysen
die Target-Nukleinsäure isoliert, anschließend amplifiziert und mit einem geeigneten
10 Analysenverfahren ausgewertet. Die Isolierung ist zeitaufwendig und schwierig zu
automatisieren. Um ausreichende Mengen Nukleinsäure für die etablierten Analysen-
verfahren zu erhalten, muß die Nukleinsäure in einem weiteren Schritt durch Ampli-
fikation vervielfältigt werden. Breitere Anwendung hat hier bisher nur die Polymerase
Kettenreaktion (PCR) gefunden.

15 Mit der „Elektrokinetischen Probenvorbereitung“ kann die gesamte Nukleinsäure-
Analytik von der Isolierung bis zur Auswertung, auch unter Vermeidung der zusätz-
lichen Amplifikation, mit bisher nicht gekannter Schnelligkeit und Automatisierung
durchgeführt werden.

20

Aufreinigung und Diagnose von Proteinen

Da unterschiedliche Proteine individuelle physikalische Eigenschaften haben, gibt es
keine universell anwendbaren Verfahren zur Aufreinigung. Anwendung finden über-
25 wiegend chromatographische und elektrophoretische Verfahren, Fällungen, Ultrafil-
tration, Ultrazentrifugation und die Größenausschlußchromatographie (Doonan, S.,
Methods Mol. Biol., 1996, 59, Totowa, N.J., Humana, 1996, 405ff). Für diagnosti-
sche Anwendungen haben sich immunologische Verfahren durchgesetzt, die das
30 Zielprotein über spezifische Antikörpererkennung nachweisen.

Aufreinigung und Diagnose von Nukleinsäuren

Um aus biologischen Material, für diagnostische Anwendungen, Nukleinsäuren zu isolieren, sind, je nach Beschaffenheit des Materials, unterschiedliche Aufschlußverfahren und anschließende Reinigungsverfahren nötig. Dabei muß wiederum gewährleistet sein, daß die zu isolierende Nukleinsäure nicht zerstört wird. Insbesondere RNA kann leicht durch ubiquitäre RNAsen degradiert werden, so daß der Zusatz von Inhibitoren für diese störenden Enzyme nötig ist (Walker, J.M., *Methods Mol. Biol.*, 1984, 2, Clifton, N.J., Humana, 1984, 113ff). Im folgenden werden die zur Zeit üblichen Verfahren umrissen:

Ein einfacher Fall für die Gewinnung von Nukleinsäure ist die Isolierung aus einer reinen Bakterienkultur: Im Falle von E. coli setzt alkalische Lyse die Nukleinsäure frei; nach Zentrifugation und Neutralisation kann dieses Rohprodukt direkt für PCR Ansätze verwendet werden (Rolfs, A. et al. PCR: Clinical Diagnosis and Research, Berlin, Springer, 1992).

In der Regel ist das Probenmaterial für die medizinische Diagnostik aber heterogener aufgebaut; Blut, Urin, Liquor, Abstrichmaterial, Sputum, Gewebeproben, Faeces, z.B. verlangen nach spezifischen Aufschlußmethoden, die wiederum je nach Fragestellung (Detektion von Bakterien, Pilzen, Viren oder genomischer Nukleinsäure aus dem Trägerorganismus) modifiziert werden müssen.

Nachfolgend eine kurze Zusammenfassung der gängigsten Aufreinigungsverfahren für diese Proben:

Phenolextraktion der Nukleinsäure mit Proteinase K-Behandlung.

Retardierung der Nukleinsäure an Membranfilter; wird aufgrund der Verstopfungsproblematik nur für vorgereinigte Proben oder gering belastete Proben - wie Urin - angewandt.

Festphasen, an die Nukleinsäuren gebunden werden können, ermöglichen Trennungen von Stör- und Begleitsubstanzen durch Waschschritte. Beispiele hierfür sind: a) Absorption an Glasmilch in Natriumjodidpuffer (Maiwald, M. et al., *BIOforum* 1994, 17, 232-237.). b) Anlagerung der negativ geladenen Nukleinsäure an schwach basische Polymere (EP 0707077 und US 5434270). c) Zellulosematrizes zur direkten Absorption von Blut, worauf dann alle Behandlungsschritte inklusive Nukleinsäurefreisetzung und Aufreinigung erfolgen. (Del Rio, S.A. et al. *Biotechniques*, 1996, 20, 970-974). d) Silicamikropartikel, welche auch in Membranen eingebettet sein können, können ebenfalls zur Nukleinsäure-Aufreinigung eingesetzt werden (WO 95/34569). Ionenaustauschermembranen (US 832284) oder chemisch modifizierte Silica-Phasen (EP 0648777) gehören ebenfalls zu dieser Gruppe.

Es sind auch Elektroelutionsapparaturen im Markt (z.B. von Biometra), um makroskopisch Proteine, Nukleinsäuren oder Viren aus Gelen zu extrahieren (EP 380357).

Um ausreichende Mengen an Nukleinsäure zu erhalten, schließt sich an die Isolierung der Nukleinsäuren üblicherweise ein Amplifikationsschritt an (EP 229701).

Ansätze zur Automation der Nukleinsäure-Analytik gibt es in Form der Anionenaustauschchromatographie und der Nukleinsäure-Adsorption mit Pipettierrobotern (BioRobot von Quiagen). In einem japanischen Patent wird die Nukleinsäure in einer Kapillare immobilisiert, um darin die Amplifikation durchführen zu können (JP 7107962).

Aufreinigung und Diagnose von Viren

Viren werden üblicherweise mit folgenden Verfahren isoliert und aufkonzentriert: Ultrazentrifugation, Elektroextraktion, Größenausschlußtrennung, Affinitätschromatographie und Fällung (Polson, Alfred, *Prep. Biochem.*, 1993; 23, Dekker, New York, N. Y., 1993). Für diagnostische Zwecke werden entweder immunologische Verfahren

auf die Proteinhülle oder nukleinsäureanalytische Verfahren nach Freisetzung der viralen Nukleinsäuren eingesetzt.

5 **Aufreinigung und Charakterisierung von Bakterien**

Bakterien werden üblicherweise durch Austreichverfahren auf Nährmedien vereinzelt und hochgezogen. Für die Isolierung und Charakterisierung stehen immunologische Verfahren - z.B. durch Fluoreszenzmarkierung - , Nukleinsäurebestimmungsmethoden
10 - nach Zellyse - zur Verfügung.

Alle Verfahren, unabhängig vom Makromolekül, sind zeitaufwendig, beinhalten zahlreiche Verdünnungsschritte und gewährleisten häufig nicht die Abtrennung von Störfaktoren. Im nachfolgenden soll der technische Stand der Mikrokanaltechnologie
15 und der amplifikationslosen Nukleinsäure-Analytik kurz skizziert werden.

Mikrokanäle

20 Die Kapillarelektrophorese ist eine relativ junge analytische Trenntechnik (St.Claire R.L., *Anal. Chem.* **1996**, 68, 569R-586R). Das Prinzip beruht auf der Trennung von Analyten in einer elektrolytgefüllten Kapillare durch Anlegen eines Hochspannungsfelds zwischen den Kapillarenden.

25 Kapillarelektrophoretische Analysenverfahren werden seit mehreren Jahren zur Analyse von biologischen Makromolekülen wie Proteinen (WO 93/22665), Nukleinsäuren (Heller, C., *J. Chromatogr. A*, **1995**, 698, 19-31) und neuerdings auch Viren (DE 4438833) eingesetzt. Die Detektion erfolgt entweder direkt mit UV oder mittels Fluoreszenzdetektion nach Markierung der Makromoleküle (Pentoney, S.L., Jr., et al.
30 *Handbook of Capillary Electrophoresis*, S.147, Landers, J.P. (Ed.) Boca Raton, CRC Press, 1994). Fast alle Gerätehersteller bieten Analysenkits für die Nukleinsäure-Analyse mit der CE an. Seit 1995 gibt es auch einen vollautomatischen Nukleinsäure-

Analysator auf Basis der CE, den ABI Prism 310 von Perkin-Elmer (Applied Biosystems). Die Injektion der Nukleinsäure in die Kapillare erfolgt üblicherweise elektrokinetisch durch Anlegen einer Spannung. Die elektrokinetische Aufgabemenge ist aber limitiert, da sonst Peakverbreiterung und Probendiskriminierung auftritt
5 (Butler, J.M., et al. *J. Chromatogr. B*, 1994, 658, 271-280).

Durch Einführung der laserinduzierten Fluoreszenzdetektion in die Kapillarelektrophorese (St.Claire R.L., *Anal. Chem.* 1996, 68, 569R-586R), die von Beckman auch bereits kommerzialisiert ist, gelang eine deutliche Empfindlichkeitssteigerung. Damit
10 lassen sich auch intakte Viren mittels CE analysieren (DE 4438833). Proteine können nur nach spezifischer Modifikation mit Fluoreszenz detektiert werden.

Aufkonzentrierung im Mikrokanal

15

Ein prinzipieller Nachteil der CE ist das geringe Injektionsvolumen, das nur wenige Nanoliter beträgt. Es gibt eine Vielzahl von Versuchen diesen Nachteil zu kompensieren (St.Claire R.L., *Anal. Chem.* 1996, 68, 569R-586R). Dazu gehören isotachophoretische Aufkonzentrierung und Stacking die beide zu einer Fokussierung der Probenbestandteile im Injektionsvolumen führen. Von Guzman wurde 1993 eine spezifische Festphasenadsorption in der Kapillare zur Probenaufkonzentrierung zum Patent angemeldet (WO 93/05390). Durch spezifische molekulare Wechselwirkung werden
20 spezielle Verbindungen einer Probe festgehalten oder durchgelassen. Eine Weiterentwicklung dieser Verfahren wurde von Tomlinson et al. mit der membrane preconcentration capillary electrophoresis gemacht (Tomlinson, A.J., et al. *J. High Res. Chromatogr.* 1995, 18, 381-383). Durch Einführen einer Umkehrphasenmembran in die Kapillare werden lipophile Probenbestandteile in einer Festphasenextraktion in der Membran festgehalten, anschließend mit einem organischen Lösungsmittel durch die Membran eluiert und kapillarelektrophoretisch
25 getrennt.
30

CE-Chips

Capillary Array Electrophoresis wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen, hauptsächlich für die Nukleinsäure-Sequenzierung, entwickelt und zum Teil auch zum Patent
5 angemeldet (WO 96/04547). In photolithographisch hergestellte Mikrokapillarsystemen wurden fluoreszierende Moleküle spannungsabhängig gesteuert und analysiert.

Ebenfalls auf Basis der Chiptechnologie wurden Mikromaschinen patentiert, die durch ein Netzwerk von Kanälen und elektrischen Schaltern eine Prozesssteuerung von Lö-
10 sungen zu synthetischen oder analytischen Zwecken möglich macht (WO 96/15450).

Amplifikationsfreie Nukleinsäure-Analysen

15 Auf Basis der hohen Empfindlichkeiten der Fluoreszenzdetektion wurde die Durchflußzytometrie zur single molecule detection zum Patent angemeldet (WO 90/14589).

Die Fluoreszenzkorrelations Spektroskopie wurde ebenfalls für biologische Screeningverfahren über single molecule detection eingesetzt (EP 731173). Auch High
20 Throughput Nukleinsäure-Sequenzierung wird auf Basis dieser Technologie bearbeitet (Harding, J.D., et al. *Trends in Biotechnology*, 1992, 10, 55-57). Diese Verfahren beruhen auf dem Nachweis eines einzelnen Fluoreszenzmoleküls in einem sehr kleinen Volumenelement.

25 Mit der vorliegenden Erfindung sollte ein automatisiertes Verfahren entwickelt werden, das es erlaubt Makromoleküle (Nukleinsäuren, Proteine, Viren und Bakterien) aus biologischen Materialien, wie z.B. Blut, Blutplasma, Serum, Liquor, Urin, Gewebeproben, Pflanzen, Zellen, Zellüberständen etc. und Aufbereitungen daraus, zu isolieren, aufzukonzentrieren und analytisch zugänglich zu machen.

30 Der zentrale Bestandteil des Probenvorbereitungsmoduls ist ein thermostatisierbarer Mikrokanal mit einer eingebrachten Membran. Dieser, mit einer leitenden Flüssigkeit gefüllte Kanal, steht auf beiden Seiten in Kontakt mit auswechselbaren oder fest

installierten Gefäßen. Durch das Anlegen einer Potentialdifferenz zwischen den Probengefäßen können geladene Moleküle elektrophoretisch mobilisiert werden. Durch die Möglichkeit eine Druckdifferenz anzulegen kann zusätzlich ein laminarer Fluß im Mikrokanal erzeugt werden. Eine vereinfachte schematische Darstellung befindet sich in Fig. 1-5.

In einem Mikrokanal (1) wird eine Membran (2) eingebracht die geeignet ist das gewünschte Makromolekül zurückzuhalten. Durch Anlegen einer Druckdifferenz (6) und/oder einer Spannung (5) an die Enden des Mikrokanals (3,4) wird ein Teil der Probe in den Kanal injiziert (Fig. 1). Die Injektion wird so lange fortgesetzt bis sich eine ausreichende Menge des gewünschten Makromoleküls im Mikrokanal befindet. Durch die Kombination der Parameter pH-Wert, Membraneigenschaften, Beschaffenheit des Mikrokanals, Polarität der Spannung und Richtung des Druckgradienten kann die Injektion auf das gewünschte Zielmolekül abgestimmt werden, so daß entweder nur das gewünschte Makromolekül in den Kanal gelangt oder durch die Membran festgehalten wird.

Der Mikrokanal hat einen Innendurchmesser von 10 - 100 µm und eine Gesamtlänge von 3 - 50 cm. Der Mikrokanal wird aus einem elektrisch nichtleitendem Material wie Polymer, Keramik, Glas oder Quarz gefertigt. Es sind prinzipiell alle synthetischen Polymere geeignet. Das Polymer muß inert gegenüber den eingesetzten Pufferlösungen sein und ist idealerweise durchlässig für optische Detektionsverfahren (z.B. Polycarbonat, Polyesteracrylat, Polymethacrylat, Polyurethan, Polyacrylamid) aber auch PTFE ist geeignet. Um günstige Oberflächeneigenschaften zu erhalten kann der Kanal innen mit einem Polymer beschichtet werden (z.B. Polyacrylamid, Silanol oder Polyvinylalkohol).

Unabhängig vom Typ des untersuchten Makromoleküls können Membranen eingesetzt werden die nach dem Größenausschlußprinzip arbeiten (Ultrafiltrationsmembran). Der Größenausschlußbereich muß der Molekülgröße des Makromoleküls angepaßt werden. Die Spannweite der Membranen reicht von M_w 3000, für kleine Proteine oder Nukleotide, über Größenausschlußbereiche im unteren nm-Bereich, für große Nukleinsäuren und Viren, bis hin zu 0,45 µm, für Bakterien und Zellen. Bei

den Membranen handelt es sich um mikrostrukturierte Polymere, vorzugsweise um Polyethersulfon (PES), Polyester, vliesgestütztem Acrylpolymer, Polytetrafluorethylen (PTFE), Polysulfon, Polypropylen (PP), Glasfaser, Nylon oder Polycarbonat. Zusätzlich können Ionenaustauschmembranen und Adsorptionsphasen eingesetzt werden. Die Wahl dieser Membranen richtet sich aber nach der Art des Makromoleküls und wird daher individuell behandelt.

Nach optimalem Wechsel des Probengefäßes (3) gegen ein Konzentrationspuffergefäß (7) wird das injizierte Makromolekül durch Anlegen einer Druckdifferenz (6) und/oder einer Spannung (5) vor oder in der Membran (2) aufkonzentriert (Fig. 2). Das gewünschte Makromolekül befindet sich dann in einem Volumen von wenigen Nanolitern.

Nach optimalem Wechsel der Gefäße (4,7) gegen die Reagenziengefäße (8,9) können die dort enthaltenen Lösungen, oder Bestandteile daraus, durch Anlegen einer Druckdifferenz (6) und/oder einer Spannung (5) in den Mikrokanal (1) gebracht werden (Fig. 3). Die Bedingungen werden so gewählt, daß das Zielmolekül dabei aufkonzentriert bleibt. Das Zielmolekül kann auf diese Weise enzymatisch oder chemisch modifiziert, und/oder durch Hybridisierung bzw. immunologische Erkennung spezifisch erkannt werden. Die Thermostatisierbarkeit des Mikrokanals (1) und die Möglichkeit die Reagenziengefäße mehrfach zu wechseln erlaubt komplexe Umsetzungen und zyklische Prozesse. In diesem Modifizierungsschritt werden auch eventuell notwendige Derivatisierungsreaktionen für eine Fluoreszenz, Chemielumineszenz oder laserinduzierte Fluoreszenzdetektion durchgeführt.

Die erforderlichen Reaktionstemperaturen werden durch Thermostatisierung des Mikrokanals (1) erreicht. Dazu wird entweder entsprechend temperierte Luft oder Flüssigkeit am Mikrokanal vorbeigeleitet. Die Wandstärke des Mikrokanals wird dabei so gewählt, daß ausreichende Wärmeabfuhr gewährleistet ist.

Nach optimalem Wechsel der Reagenziengefäße (8,9) gegen die Puffergefäße (10,11) wird das Zielmolekül, durch Anlegen einer Druckdifferenz (6) und/oder einer Spannung (5) mobilisiert (Fig. 4). Durch optische Detektionsverfahren (12), wie

Absorption oder Fluoreszenz, kann das Molekül direkt im Mikrokanal (1) analytisch bestimmt werden (13). Es stehen die analogen Detektionsverfahren wie in der CE zur Verfügung (St.Claire R.L., *Anal. Chem.* 1996, 68, 569R-586R).

5 Dazu wird der Mikrokanal entweder komplett oder an einer Stelle transparent für optische Strahlung gemacht. Dazu muß die Transmission der Anregungsstrahlung und der Fluoreszenzstrahlung gewährleistet sein. Vorzugsweise handelt es sich um die eingangs erläuterten nichtleitenden Materialien. Die Fluoreszenzstrahlung wird in einem definierten Winkel von 0-180° senkrecht oder in Reflexion zur Einstrahlwellenlänge
10 gemessen. Vorzugsweise wird bei 45° oder 90° eingestrahlt.

Das hochkonzentrierte Analysentarget steht aber auch für weitergehende Analysen zur Verfügung (Fig. 5). So kann das Zielmolekül in das Analysengefäß (14) oder in oder auf ein beliebiges anderes Analysentarget fraktioniert werden.

15 Im Analysengefäß (14) befinden 1-1000 ml eines für die weitere Analyse geeigneten Puffers. Beispielsweise handelt es sich um PBS-Puffer, Tris/Borat oder einen Tris-Glycin-Puffer. Bei dem Analysengefäß (14) kann es sich auch um ein planares Analysentarget handeln, beispielsweise um einen massenspektrometrischen
20 Probenträger. Der elektrische Kontakt wird entweder direkt über das leitende Analysentarget erreicht oder durch Benetzung der Oberfläche zwischen Elektrode und Mikrokanal mit einer elektrisch leitenden Flüssigkeit.

25 Wird der Kanal zusätzlich verzweigt kann das aufkonzentrierte Zielmolekül durch Umschalten von Druck oder Spannung in weitere Kanäle für weitergehende Analysen oder Umsetzungen gebracht werden und ist daher direkt kompatibel mit der CE-Chip-technologie (WO 96/04547).

30 Fraktionierte Makromoleküle können mit allen denkbaren Verfahren weiter analysiert werden. Das hochkonzentrierte Makromolekül wird in weniger als einem Mikroliter eluiert und kann direkt in geeignete flüssige Matrices oder auch auf feste Probenträger aufgebracht werden.

Eine schematische Darstellung des parallelen Aufbaus befindet sich in Fig. 6. Die Mikrokanäle (1) werden aus nichtleitenden Materialien, wie Polymer, Keramik, Glas, Quarz oder Keramik (15) hergestellt und gegebenenfalls beschichtet. Die Kanalblöcke werden mit einer Membranzwischenschicht (2) zusammengefügt, so daß die Kanäle an der Membran aufeinanderstoßen. Die Anordnung der Kanäle richtet sich nach dem Probenformat. Nicht dargestellt sind die nachfolgenden Zusatzeinrichtungen. Zur Abfuhr der Joulschen Wärme werden gegebenenfalls zusätzliche Thermostatisierelemente eingeführt. Die Kanäle werden an den Enden so verjüngt, daß Sie in jeweiligen Gefäße eingeführt werden können oder sind dicht mit fest installierten Gefäßen verbunden. Für den elektrischen Kontakt werden, entweder an den Kanalenden oder in den Gefäßen, Elektroden angebracht und mit einer Hochspannungsquelle versorgt.

Für die Thermostatisierung werden beispielsweise Kanäle in den Analysenblock gelegt, die senkrecht zur Richtung und zwischen den Ebenen der Mikrokanäle liegen. Durch diese Kanäle kann entsprechend temperierte Luft oder Flüssigkeit gepumpt werden.

Für eine deutlich schnellere Aufkonzentrierung der Proben wurde eine parallele Kapillaranordnung entwickelt. Die schematische Darstellung dieses Moduls befindet sich in Fig. 7. Neben dem Mikrokanal (1) befindet sich der deutlich breitere Kanal (16). Die Höhe des Kanals entspricht der Dimension des Mikrokanals (10-100 μm), so daß die Joulsche Wärme nach wie vor gut abgeführt werden kann. Die Breite des Kanals (100 μm bis 10 mm) erlaubt aber Flüsse die um bis zu 10^3 höher liegen als im Mikrokanal (1). Die Membran wird zwischen die Modulblöcke (15) eingespannt. Das gesamte Modul ist damit 3 bis 10 cm lang, 1 bis 50 mm breit und 0,1 bis 50 mm stark. Die Kanalenden sind wiederum entweder mit austauschbaren oder fest installierten Probengefäßen verbunden. Durch parallele Anordnung kann auch ein analoger Aufbau wie in Fig. 6 erreicht werden. Die Makromoleküle werden im Kanal (16) aufkonzentriert und dann über den Transferkanal (17) in den Mikrokanal überführt und analog den Verfahren aus Fig. 1-6 weiter bearbeitet. Die schematische Anreicherung von Makromolekülen mit dieser schnellen Aufkonzentrierung ist am Beispiel von Nukleinsäuren nachfolgend beschrieben.

Die Anreicherung von Nukleinsäure aus salzhaltiger Lösung erfolgt durch Anlegen einer Spannung an den Flachkanal (16) (Fig. 8a). Neben dem Überschuß an kleinen Anionen (kleine schwarze Kugeln) wird auch die Nukleinsäure aus der Probe injiziert. Die anionischen Moleküle wandern durch die Membran (2) und werden damit von der Nukleinsäure entfernt. Die Spannung wird so lange beibehalten, bis alle Nukleinsäuren an der Membranoberfläche immobilisiert sind (Fig. 8b). Wird nun zwischen dem Flachkanal (16) und dem Mikrokanal (1), wie angegeben eine Spannung angelegt, so wandert die aufgereinigte und aufkonzentrierte Nukleinsäure von der großen Membranoberfläche des Flachkanals (16) zur Membran des Mikrokanals (Fig. 8c) und steht anschließend für die weitere Behandlung und Analyse (Fig. 3-6) zur Verfügung. Bei diesem Transferschritt können auch simultan Modifizierungsreaktionen am aufkonzentrierten Makromolekül durchgeführt werden.

1. Beschreibung der Nukleinsäuren-Aufkonzentrierung

15

1.1. Nukleinsäure wird mit einem geeigneten, etablierten Verfahren (Lyse, Hydrolyse, Ultraschall, etc.) aus der zu untersuchenden Probe freigesetzt und mit einem geeigneten sauren Extraktionspuffer versetzt. Der Puffer muß so konzipiert sein, daß nichtnukleotidische Bestandteile der Lösung keine anionische Überschußladung tragen. Unterhalb eines pH-Werts von ca. 5 zeigen Proteine keine negative Überschußladung mehr. Es können anorganische Säuren wie Salzsäure, Phosphorsäure oder Schwefelsäure wie auch organische Phosphorsäurederivate oder Sulfonsäuren eingesetzt werden. Vorzugsweise wird aber ein polymergebundener, saurer Ionenaustauscher (z.B. Polystyrolsulfonsäure) eingesetzt. Durch Verwendung des Ionenaustauschers wird der saure pH-Wert erreicht ohne zusätzlich Anionen in die Lösung einzuführen. Die elektrokinetische Nukleinsäure-Extraktion wird dadurch begünstigt.

20

25

30

1.2. Die Nukleinsäure wird aus dieser sauer gepufferten Lösung elektrophoretisch extrahiert. Dazu wird in die Lösung eine Elektrode eingeführt und auf kationisches Potential gebracht. Die Elektrode im Puffergefäß (4) (Fig. 1) wird auf anodisches Potential gebracht und der

Mikrokanal (1) wird mit einer elektrisch leitenden Flüssigkeit gefüllt. Die Zusammensetzung des Elektrolyts richtet sich nach der Art der Immobilisierungstechnik. Vorzugsweise handelt es sich um einen wäßrigen Puffer auf Borat-, Phosphat- oder Citrat-Basis. Auch Glycin ist ein geeignetes Pufferion. Die Pufferkonzentration liegt zwischen 10 und 100 mMol/l. Der pH-Wert liegt zwischen 2,5 und 8,5. Beispielsweise Natriumcitrat (20 mmol/l, pH 5.0) oder Tris/Borat (100 mmol/l, pH 8,5). Wahlweise wird ein Modifier, vorzugsweise ein chaotropes Agens, wie z.B. Harnstoff in molarer Konzentration zugesetzt. Die Aufgabe kann mittels UV- oder Fluoreszenzdetektion - nach vorheriger Derivatisierung - im Mikrokanal (1) verfolgt werden.

1.3. Die extrahierte Nukleinsäure wird im Kanal mit Hilfe der eingebrachten Membran unter Beibehaltung der Spannung immobilisiert und konzentriert (Fig. 2). Für Nukleinsäuren eignen sich zusätzlich zu den Größenausschlußmembranen auch weiche Anionenaustauscher beispielsweise auf Aminbasis. Vorzugsweise handelt es sich um Alkylamin-, Imidazol- oder Pyrrolidon- substituierte Polymere. Die Nukleinsäuren können auch durch Adsorption an Membranen retardiert werden. Beispielsweise enthalten die Membranen Nanopartikel, vorzugsweise Silica-basierend oder Metalloxidpigmente. Mit immobilisierten Oligonukleotiden werden spezifische Nukleinsäurestränge durch Festphasenhybridisierung immobilisiert.

1.4. Die auf wenige Nanoliter konzentrierte Nukleinsäure kann vielfältig modifiziert und analysiert werden (Fig. 3). Das offene Kanalsystem erlaubt die Zuführung und Abführung von Reagenzien mittels Druck oder Spannung. Die Polarität der Spannung wird wie bei der Extraktion und Fokussierung beibehalten. Kombiniert mit einer geeigneten Temperaturregelung sind in dem Mikrosystem enzymatische Spaltungen, Sanger-Sequenzierungen, Gensonden-Hybridisierung, aber auch PCR-Reaktionen möglich.

Beispielsweise kann die Nukleinsäure mit interkalierenden Farbstoffen markiert werden. Vorzugsweise handelt es sich um fluoreszierende Derivate, wie Ethidiumbromid, Acridinorange, bzw. deren Dimeren wie 1,1'-(4,4,7,7-Tetramethyl-4,7diazundecamethylen)-bis-4-[3-methyl-2,3-dihydromethyl-(benzo-1,3-oxazol)-2methyliden]-chinolinium Tetraiodid (YOYO). Die Wahl des Farbstoffes richtet sich in erster Linie nach der gewählten Detektionseinheit. YOYO ist beispielsweise ideal für die Fluoreszenzdetektion nach Anregung mit einem Argon-Laser, während das entsprechende YOPRO-Dimer ideal zum Infrarot-Laser paßt. Diese Farbstoffe zeichnen sich auch dadurch aus, daß kaum Hintergrundfluoreszenz auftritt, da diese Farbstoffe nur im interkalierten Zustand fluoreszieren. Das positiv geladene YOYO kann beispielsweise vom Reaktionsgefäß (9), unter Beischialtung der Fukussierspannung, elektrokinetisch eingeführt werden.

Deutlich höhere Spezifität kann beispielsweise durch eine fluoreszenzmarkierte Gensonde erreicht werden. Die Gensonde besteht aus einer zur Zieinukleinsäure komplementären Nukleotidsequenz die eine oder mehrere Fluoreszenzfarbstoffe trägt. Die Wahl des Farbstoffes richtet sich in erster Linie nach der gewählten Detektionseinheit. Fluorescein-isothiocyanat oder reaktive Cumarinderivate werden vorzugsweise für die Fluoreszenzdetektion nach Anregung mit einem Argon-Laser eingesetzt.

Enzymkatalysierte Reaktionen wie Restriktionsenzymverdau, PCR-Reaktion und Sanger Sequenzierung werden durchgeführt indem die erforderlichen Enzyme und benötigten Substrate zur Nukleinsäure im Mikrokanal transportiert werden.

1.5. Die konzentrierte Nukleinsäure kann in einem geeigneten Puffer durch Anlegen von Druck und/oder Spannung in wenigen Nanoliter eluiert werden und steht für weitere Analysen zur Verfügung.

Die Spannung wird dazu umgepolt, so daß nun die Anode im Analysegefäß (14) (Fig. 5) liegt. Vorzugsweise wird der Mikrokanal und das Puffergefäß (11) vorher mit einem wäßrigen Puffer der oben genannten Zusammensetzung gefüllt. Als nachfolgende Analysen können

5 PCR-Reaktion, CE-Trennungen, DNA-Sequenzierungen, Hybridisierungsreaktionen massenspektrometrische Analysen oder molekularbiologische Verfahren durchgeführt werden.

- 1.6. Innerhalb des Mikrosystems ist die Nukleinsäure elektrophoretisch analysierbar (Fig. 4). Wie bei der Elution wird das Puffergefäß (10) dabei auf anodisches Potential gebracht. In einem geeigneten Siebmedium können Nukleinsäure-Fragmente größenabhängig getrennt werden.
- 10

Die Puffergefäße (10,11) sowie der Mikrokanal (1) werden dazu mit einer polymerhaltigen Pufferlösung gefüllt. Vorzugsweise handelt es sich dabei um lineare lösliche Polymere zum Beispiel Acrylamid, Polyvinylalkohol, Zellulose (modifiziert und unmodifiziert), Dextran, oder Agarose. Die sonstige Pufferzusammensetzung entspricht der allgemeinen Zusammensetzung.

15

- 1.7. Durch Verwendung fluoreszenzmarkierter Sonden, fluoreszenzmarkierter Terminatoren in der Sanger-Sequenzierung oder interkalierender Farbstoffe ist eine direkte Fluoreszenzdetektion der Nukleinsäure im Mikrosystem möglich.
- 20

2. Viren

- 2.1. Die virushaltige Probe wird auf einen solchen pH-Wert gebracht, daß das zu untersuchende Virus, oder die zu untersuchenden Viren, eine negative Überschubladung trägt. Falls erforderlich können vorher Nukleaseverdaus oder Virusmodifikationen durchgeführt werden.
- 25
- 30

Die geeigneten Puffer sind bereits im allgemeinen Verfahren beschrieben worden. Der pH-Wert des Puffers muß deutlich über dem pK-Wert des Virus liegen. Auf saure Puffer wie Natriumcitrat wird daher verzichtet, ebenso finden Modifizierungsreagenzien keine Anwendung. Nukleaseverdaus werden vorzugsweise durch Zugabe von RNAsen oder DNAsen durchgeführt. Hervorragend geeignet ist beispielsweise die Benzonase. Modifizierungsreaktionen können in Form von Anfärbungsreaktionen mit interkalierenden Farbstoffen (vgl. 1.4) oder durch Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchgeführt werden. Die Wahl des Farbstoffes richtet sich in beiden Fällen nach der gewählten Detektionsart.

2.2. Die negativ geladenen Viren werden aus dieser gepufferten Lösung elektrophoretisch extrahiert. Dazu wird in die Lösung eine Elektrode gebracht und auf kationisches Potential gebracht. Die Elektrode im Puffergefäß (4) (Fig. 1) wird auf anodisches Potential gebracht und der Mikrokanal (4) wird mit einer elektrisch leitenden Flüssigkeit gefüllt. Die Zusammensetzung des Elektrolyts entspricht der allgemeinen Pufferzusammensetzung. Die Aufgabe kann mittels UV oder Fluoreszenz verfolgt werden. Während der Injektion kann zusätzlich eine Druckdifferenz zwischen den Puffergefäßen (3 und 4) angelegt werden.

2.3. Die extrahierten Viren werden im Kanal mit Hilfe der eingebrachten Membran immobilisiert und konzentriert (Fig. 2). Die Membran arbeitet nach dem Größenausschlußprinzip, wobei die Porengröße virusabhängig zwischen 10 und 200 nm liegt.

2.4. Die auf wenige Nanoliter konzentrierten Viren können vielfältig modifiziert und analysiert werden (Fig. 3). Das offene Kanalsystem erlaubt die Zuführung und Abführung von Reagenzien mittels Druck oder Spannung. Kombiniert mit einer geeigneten Temperaturregelung sind in dem Mikrosystem alle Derivatisierungsverfahren für Proteine und Nukleinsäuren möglich (vgl. 1.4 und 3.4). Die Viren können auch auf

der Membran lysiert und anschließend die Nukleinsäuren und/oder die Proteine analysiert werden (vgl. 1.4-1.7 und 3.4-3.7).

5 Die Größenausschlußmembran muß im Fall der Viruslyse so dimensioniert sein, daß die Zielproteine, bzw. Nukleinsäuren ebenfalls retardiert werden. Es ist prinzipiell jedes Lyseprotokoll geeignet. Vorzugsweise finden denaturierende Bedingungen wie extreme pH-Werte, chaotrope Reagenzien oder Detergenzien Anwendung. Beispiele sind verd. Natronlauge, Guanidinium-Hydrochlorid oder Natriumdodecylsulfat
10 (SDS). Durch Verwendung nichtionischer Detergenzien (z.B. NP-40) kann von behüllten Viren die Lipoproteinmembran entfernt werden.

2.5. Die konzentrierten Viren können in einem geeigneten Puffer durch Anlegen von Druck und/oder Spannung in wenigen Nanoliter eluiert
15 werden und stehen für weitere Analysen zur Verfügung.

Die Spannung wird dazu umgepolt, so daß nun die Anode im Analysengefäß (14) (Fig. 5) liegt. Vorzugsweise wird der Mikrokanal (1) und das Puffergefäß (11) vorher mit einem wäßrigen Puffer der oben
20 genannten Zusammensetzung gefüllt. Nach Fraktionierung in ein puffergefülltes Analysengefäß (14) können mit den Viren beispielsweise Pathogenitätsassays oder CE-Trennungen durchgeführt werden. Nach Fraktionierung auf ein planares Analysentarget (14) können die Viren beispielsweise direkt elektronenmikroskopisch untersucht werden.
25

2.6. Innerhalb des Mikrosystems sind die Viren elektrophoretisch analysierbar. Wie bei der Eluion wird das Puffergefäß (10) dabei auf anodisches Potential gebracht (Fig. 4).

30 2.7. Durch Verwendung fluoreszenzmarkierender Verfahren für Proteine oder Nukleinsäuren (vgl. 1.4 und 3.4) können die Viren auch fluoreszenzspektroskopisch identifiziert werden.

3. Proteine

- 5 3.1. Die proteinhaltige Probe wird auf einen pH-Wert gebracht der mindestens eine log-Stufe neben dem pK-Wert des Proteins liegt. Wenn es die Löslichkeitseigenschaften des Proteins erlauben, wird der pH-Wert unterhalb des pK-Werts des Proteins gelegt, so daß das Protein positiv geladen vorliegt. Im folgenden soll dieser Fall durchdiskutiert werden.
- 10 Für negativ geladene Proteine kehren sich die Spannungsverhältnisse entsprechend um. Geeignete Puffer entsprechen den allgemeinen Bedingungen. Vorzugsweise finden alkaligepufferte Phosphat- und Citratpuffer Anwendung, z.B. Natriumcitrat, 20 mmol/l, pH 2,5.
- 15 3.2. Die positiv geladenen Proteine werden aus dieser gepufferten Lösung elektrophoretisch extrahiert. Dazu wird in die Lösung eine Elektrode gebracht und auf anionisches Potential gebracht. Die Elektrode im Puffergefäß (4) (Fig. 1) wird auf kathodisches Potential gebracht und der Mikrokanal (4) wird mit dem Puffer gefüllt. Die Zusammensetzung
- 20 des Elektrolyts richtet sich nach der Art der Immobilisierungstechnik und entspricht den allgemeinen Bedingungen. Wahlweise wird ein Modifizier, vorzugsweise ein organisches Lösungsmittel, wie z.B. Methanol zwischen 5 und 30 % zugesetzt. Die Aufgabe kann mittels UV- oder Fluoreszenzdetektion - nach vorheriger Derivatisierung - im Mikro-
- 25 kanal (1) verfolgt werden.
- 30 3.3. Die extrahierten Proteine werden im Kanal mit Hilfe der eingebrachten Membran immobilisiert und konzentriert (Fig. 2). Neben den Größenausschlußmembran eignen sich für Proteine auch Ionenaustauschermembranen. Für negativ geladene Proteine finden als weiche Anionenaustauscher vorzugsweise DEAE-Phasen Anwendung. Als starke Anionenaustauscher finden hauptsächlich quartäre Ammoniumphasen

Verwendung. In dem hier diskutierten Fall der kationischen Proteine eignen sich als weiche Austauscher hauptsächlich Carbonsäure-Phasen und als starke Austauscher Sulfonsäurephasen. Für spezielle Proteine können die Membranen mit entsprechenden Antikörpern belegt werden und so über Affinität angereichert werden.

5

- 3.4. Die auf wenige Nanoliter konzentrierten Proteine können vielfältig modifiziert und analysiert werden (Fig. 3). Das offene Kanalsystem erlaubt die Zuführung und Abführung von Reagenzien mittels Druck oder Spannung. Die Polarität der Spannung wird wie bei der Extraktion und Fokussierung beibehalten. Kombiniert mit einer geeigneten Temperaturregelung sind in dem Mikrosystem enzymatische Spaltungen, Komplexierungen, chemische Derivatisierungen oder Antikörperbindungen möglich.

10

15

Beispielsweise kann das Protein mit Reaktivfarbstoffen umgesetzt werden. Vorzugsweise handelt es sich um aminspezifische Farbstoffe wie z.B. Fluoresceinisothiocyanat (FITC). Die Wahl des Farbstoffes richtet sich in erster Linie nach der gewählten Detektionseinheit. FITC ist beispielsweise ideal für die Fluoreszenzdetektion nach Anregung mit einem Argon-Laser.

20

Deutlich höhere Spezifität kann beispielsweise durch fluoreszenzmarkierten Antikörpern erreicht werden. Bei der anschließenden Trennung wird dann der Protein-Antikörper-Komplex mittels Fluoreszenz bestimmt.

25

- 3.5. Die konzentrierten Proteine können in einem geeigneten Puffer durch Anlegen von Druck und/oder Spannung in wenigen Nanolitern eluiert werden und stehen für weitere Analysen zur Verfügung.

30

Die Spannung wird dazu umgepolt, so daß nun die Kathode im Analysengefäß (14) (Fig. 5) liegt. Vorzugsweise wird der Mikrokanal und

das Puffergefäß (11) vorher mit einem wäßrigen Puffer der oben genannten Zusammensetzung gefüllt. Als nachfolgende Analysen können CE-Trennungen, massenspektrometrische Analysen, Enzymassays, Bindungsstudien oder immunologische Verfahren durchgeführt werden.

5

3.6. Innerhalb des Mikrosystems sind die Proteine elektrophoretisch analysierbar (Fig. 4).

10

3.7. Durch Verwendung fluoreszenzmarkierter Antikörper, fluoreszierender Enzymsubstrate, fluoreszierender Bindungspartner oder Derivatisierungsreagenzien können die Proteine auch fluoreszenzspektroskopisch identifiziert werden.

15

4. Bakterien

4.1. Die bakterienhaltige Probe wird auf einen solchen pH-Wert gebracht, daß das zu untersuchende Bakterium eine negative Überschußladung trägt. Falls erforderlich können vorher Nukleaseverdaus oder Proteinmodifikationen durchgeführt werden.

20

Die geeigneten Puffer sind bereits im allgemeinen Verfahren beschrieben worden. Der pH-Wert des Puffers muß deutlich über dem pK-Wert des Bakterium liegen. Auf saure Puffer wie Natriumcitrat wird daher verzichtet, ebenso finden Modifizierungsreagenzien keine Anwendung. Nukleaseverdaus werden vorzugsweise durch Zugabe von RNAsen oder DNAsen durchgeführt. Hervorragend geeignet ist beispielsweise die Benzonase. Modifizierungsreaktionen können in Form von Anfärungsreaktionen mit interkalierenden Farbstoffen (vgl. 1.4) oder durch Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchgeführt werden. Die Wahl des Farbstoffes richtet sich in beiden Fällen nach der gewählten Detektionsart.

25

30

- 4.2. Die negativ geladenen Bakterien werden aus dieser gepufferten Lösung elektrophoretisch extrahiert. Dazu wird in die Lösung eine Elektrode gebracht und auf kationisches Potential gebracht. Die Elektrode im Puffergefäß (4) (Fig. 1) wird auf anodisches Potential gebracht und der Mikrokanal (4) wird mit einer elektrisch leitenden Flüssigkeit gefüllt. Die Zusammensetzung des Elektrolyts richtet sich nach der Art der Immobilisierungstechnik. Die Aufgabe kann mittels UV oder Fluoreszenz verfolgt werden.
- 4.3. Die extrahierten Bakterien werden im Kanal mit Hilfe der eingebrachten Membran immobilisiert und konzentriert (Fig. 2). Die Membran arbeitet nach dem Größenausschlußprinzip (Ultrafiltrationsmembran) oder dem Ionenaustauscherprinzip (Anionenaustauscher). Vorzugsweise finden Membranen für die Sterilfiltration mit einer Ausschlußgröße von $0,1 - 0,45 \mu\text{m}$ Verwendung. Es können aber auch die gleichen Anionenaustauscher wie für die Proteine eingesetzt werden (vgl. 3.3.)
- 4.4. Die auf wenige Nanoliter konzentrierten Bakterien können beispielsweise auf der Membran lyophilisiert und anschließend die Proteine oder Nukleinsäuren vielfältig modifiziert und analysiert werden (Fig. 3). Das offene Kanalsystem erlaubt die Zuführung und Abführung von Reagenzien mittels Druck oder Spannung. Kombiniert mit einer geeigneten Temperaturregelung sind in dem Mikrosystem alle Derivatisierungsverfahren für Proteine und Nukleinsäuren möglich (vgl. 1.4 - 1.7 und 3.4 - 3.7).
- Die Größenausschlußmembran muß im Fall der Bakterienlyse so dimensioniert sein, daß die Zielproteine, bzw. Nukleinsäuren ebenfalls retardiert werden. Es ist prinzipiell jedes Lyseprotokoll geeignet. Vorzugsweise finden denaturierende Bedingungen wie extreme pH-Werte, chaotrope Reagenzien oder Detergenzien Anwendung. Beispiele sind verd. Natronlauge, Guanidinium-Hydrochlorid, Harnstoff oder Natriumdodecylsulfat (SDS).

- 4.5. Die konzentrierten Bakterien können in einem geeigneten Puffer durch Anlegen von Druck und/oder Spannung in wenigen Nanoliter eluiert werden und stehen für weitere Analysen zur Verfügung.

5

10

15

Die Spannung wird dazu umgepolt, so daß nun die Anode im Analysengefaß (14) (Fig. 5) liegt. Vorzugsweise wird der Mikrokanal (1) und das Puffergefäß (11) vorher mit einem wäßrigen Puffer der oben genannten Zusammensetzung gefüllt. Nach Fraktionierung in ein puffergefülltes Analysengefaß (14) können mit den Bakterien beispielsweise Pathogenitätsassays oder elektrophysiologische Experimente durchgeführt werden. Nach Fraktionierung auf ein planares Analysentarget (14) können die Bakterien beispielsweise direkt licht- oder elektronenmikroskopisch untersucht werden, oder z.B. mikrobiologisch auf einer Agarplatte über Plaques identifiziert werden.

- 4.6. Innerhalb des Mikrosystems sind die Bakterien elektrophoretisch analysierbar (Fig. 4).

20

- 4.7. Durch Verwendung fluoreszenzmarkierter Antikörper oder fluoreszierender Bindungspartner können die Bakterien auch fluoreszenzspektroskopisch identifiziert werden.

25

30

Alle gängigen Verfahren der Makromolekül-Isolierung setzen die Prozessierung des gesamten Probenvolumens durch das Extraktionsmedium voraus. Die Handhabung großvolumiger Proben verhindert aber die Miniaturisierung die ihrerseits unbedingt nötig ist um die Analysengeschwindigkeit und die Sensitivität zu steigern. Durch die Kombination von direkter elektrophoretischer Extraktion mit einer Immobilisierungsmembran im Mikromaßstab ist es erstmals möglich große Probenvolumina direkt mit einer Nanoanalysetechnik zu kombinieren.

Gegenüber den etablierten Verfahren zeichnet sich das Verfahren vor allem durch die vereinfachte Isolierung und extreme Anreicherungsraten aus.

Wird die Probe elektrophoretisch oder mit Druck aus dem Mikrokanal eluiert, können anschließend weitere Nanoanalysenverfahren durchgeführt werden. Nach Verdünnung steht die isolierte Probe auch für konventionelle makroskopische Analysenverfahren zur Verfügung. Das Verfahren stellt dann ein sehr effizientes Probenvorbereitungs-
5 modul für diese Techniken dar.

Durch die Aufkonzentrierung von Nukleinsäuren können in vielen Fällen zusätzliche Amplifikationsschritte vermieden werden. Das Verfahren kann damit beispielsweise
10 die PCR ersetzen.

Das Verfahren kann auch als Aufschlußverfahren für Viren, Bakterien und andere Zellen eingesetzt werden. Beispielsweise wird Bakteriummaterial isoliert, anschließend wird das Bakterium im Mikrokanal aufgeschlossen und die freigesetzte
15 Nukleinsäure derivatisiert und analysiert.

Das Verfahren kann vorteilhaft zur direkten Nukleinsäure-Sequenzierung für Diagnostik und Forschung eingesetzt werden. Im Falle menschlicher DNA ist hierbei eine Analyse auf erbliche genetische Defekte möglich, die durch Deletionen, Mutationen oder Translokationen hervorgerufen werden. Als mögliche Einsatzgebiete
20 seien hier genannt: Cystische Fibrose, Down's Syndrom, Sichelzellanämie, Huntington's Chorea, Hämophilie A und B. Eine weitere Anwendung dieser Nukleinsäureanalytik liegt in der Tumordiagnostik sowie der allgemeinen Erkennung für genetische Prädispositionen für bestimmte Krankheiten. Hierbei ist die Analyse
25 von Tumorsuppressorgen und Oncogenen von besonderem Interesse.

Eine weitere Verwendung liegt in der Kombination mit Nukleinsäureamplifizierungsverfahren (wie z. B. PCR).

30 Das Verfahren kann auch zur direkten Gensondenanalytik von medikamentenresistenten Keimen oder zur Subklassifizierung eingesetzt werden.

Als Qualitätssicherungsmethode ermöglicht die Erfindung auch die Kontrolle von gentechnologisch hergestellten Produkten, bei denen Nukleinsäurefreiheit gewährleistet sein muß.

- 5 Die Untersuchung von intakten Viren, Bakterien oder deren Nukleinsäure oder deren Proteine kann für die Infektionsdiagnostik eingesetzt werden. Auch Nukleinsäuren oder Proteine von Pilzen oder Parasiten können für diese Zwecke analysiert werden. Als wichtigste virale Vertreter seien hier exemplarisch im Falle der Viren HIV 1u. 2, HTLV, HSV, CMV, HPV, Hepatitis A, B, C, D, E, F, G, VZV, Rotaviren, EBV und
- 10 Adenoviren genannt. Zu den wichtigsten bakteriellen Vertretern gehören unter anderen Chlamydien, Mycobakterien, Shigella, Campylobacter, Salmonellen, Neisserien, Staphylokokken, Streptokokken, Pneumokokken. Bei den Pilzen zählen zu den wichtigsten Pathogenen Candida, Aspergillus sowie Cryptococcus.
- 15 Ein weiteres Einsatzgebiet ist in der Sicherheitsüberwachung von biologischen Proben zu sehen. Die Bedeutung liegt hier z.B. bei der Überprüfung von Blutspenden sowie aller aus Blut hergestellter Produkte. Die Einsatzgebiete entsprechen weitgehend denen der Infektionsdiagnostik.
- 20 Dieses Verfahren erlaubt erstmals den direkten hochsensitiven Nachweis von intakten Viren. Dabei können beliebige, auch unbekannte Viren direkt gemessen werden. Dies hat sowohl für die Infektionsdiagnostik, als auch für die Sicherheit von Produkten aus biologischen Materialien enorme Bedeutung, da mit allen anderen Verfahren nur spezielle Viren individuell nachgewiesen werden können.
- 25 Die durch elektrokinetische Probenvorbereitung erhaltenen Proteine sind aufgrund ihrer Anreicherung und Aufreinigung einer anschließenden immundiagnostischen Analytik leichter zugänglich. Hierbei haben in Humandiagnostik verschiedene Proteine wie z. B. Transferrin, Fibrinogen, β -2 Microglobulin, hCG oder
- 30 Tumormarker (AFP, CEA, CA 15-3, CA 19-9) hohe diagnostische Relevanz.

Beispiele

Elektrokinetische Injektion von Nukleinsäure

- 5 Zur Überprüfung der elektrokinetischen Injektion von Nukleinsäure wurde Modell-DNA durch das Anlegen von Spannung in einen Mikrokanal injiziert und mittels UV vermessen. Das Experiment sollte zeigen, daß es möglich ist Nukleinsäure elektrokinetisch zu extrahieren.
- 10 Es wurde eine Verdünnungsreihe von pBr-DNA (Boehringer Mannheim) von 250 bis 1,25 mg/l hergestellt und im Probengefäß vorgelegt. Nach der Injektion wurde elektrophoretisch getrennt. Die Meßbedingungen befinden sich in Tabelle 1.
- 15 Trägt man die Peakflächen gegen die DNA-Konzentration auf, so zeigt sich eine Sättigung der Peakflächenzunahme für hohe DNA-Konzentrationen. Die injizierte DNA-Menge wird über 100 mg/l durch den elektrischen Strom und nicht durch die DNA-Konzentration limitiert. Damit konnte gezeigt werden, daß Nukleinsäure über einen weiten Konzentrationsbereich elektrokinetisch aus einer Lösung aufkonzentriert werden kann.

Tabelle 1: Meßparameter zur elektrokinetischen Nukleinsäure-Injektion.

Spannung:	-20 kV
Puffer:	Natriumcitrat (20 mmol/l, pH 5.0, Fluka)
Kapillare:	PVA-gecoatete Quarzkapillare, 50 µm Innendurchmesser, 64,5 cm Länge, 56 cm zum Detektor (Hewlett-Packard, Waldbronn)
Kapillarelektrophoresegerät:	³ HHPCE (Hewlett-Packard, Waldbronn)
Temperatur:	25°C
Detektion:	DAD 190-600nm, λ 260 \pm 8 nm
Injektion:	elektrokinetisch (20 sec x -10 kV)
Spülen der Kapillare vor der Injektion:	1. Wasser (1 min, 5 x 10 ⁴ Pa) 2. Puffer (3 min, 5 x 10 ⁴ Pa)

5

Wiederfindungsrate von Größenausschlußmembran

Zur Überprüfung der Retardierung von Nukleinsäure an einer Größenausschlußmembran wurde pBr-DNA elektrokinetisch in den Mikrokanal injiziert und anschließend elektrophoretisch im Kanal zur Anode mobilisiert. Zwischen dem Injektionsende des Kanals und der im Kanal vorhandenen Größenausschlußmembran befand sich ein UV-Detektor (vgl. Fig. 4). Die pBR-DNA (250 mg/l) wurde am Detektor vorbei elektrophoriert und die Elektrophorese wurde so lange fortgesetzt, daß die DNA den Kanal ohne Membran bereits verlassen hätte. Dann wurde die Spannung umgepolt und so die retardierte DNA wieder am Detektor vorbei bewegt. Die Meßparameter befinden sich in Tabelle 2.

10

15

Tabelle 2: Meßparameter zur elektrophoretischen Nukleinsäure-Wiederfindung von einer Größenausschlußmembran.

Spannung:	-10 kV für 10 min, dann + 10 kV für 10 min
Puffer:	Tris/Borat (100 mmol/l, pH 8,5)
Kapillare:	gecoatete Quarzkapillare, 75 µm Innendurchmesser, 34 cm Länge, 8,5 cm zum Detektor (Biorad, München)
Membran:	Nach 20 cm wurde die Kapillare getrennt und nach Einführung der Membran (memfil PCTE 10 nm von Membrapure) mit einem Teflonschrumpfschlauch wieder verbunden.
Kapillarelektrophoresegerät:	³ H)HPCE (Hewlett-Packard, Waldbronn)
Temperatur:	25°C
Detektion:	DAD 190-600 nm, λ 260 \pm 8 nm
Injektion:	elektrokinetisch (10 sec x -10 kV)
Spülen der Kapillare vor der Injektion:	1. Wasser (1 min, 5 x 10 ⁴ Pa) 2. Puffer (3 min, 5 x 10 ⁴ Pa)

5

Die elektrokinetisch injizierte DNA migrierte nach 1,7 min durch den UV-Detektor. Ohne Größenausschlußmembran würde die DNA nach 7 min den Kanal wieder verlassen. Die Elektrophorese wurde aber insgesamt 10 min fortgesetzt und dann die Spannung direkt umgepolt. Die retardierte DNA in der Kapillare wanderte wieder zurück durch den UV-Detektor. Nach 12,05 min konnte ein Signal detektiert werden, das exakt der Peakfläche der injizierten DNA entsprach. Das analoge Experiment mit 3-Nitrobenzolsulfonsäure zeigte, wie erwartet, nur den Injektionspeak und damit keine Retardierung an der Größenausschlußmembran.

10

15

In einem weiteren Experiment wurden drei aufeinanderfolgende Injektionen an Nukleinsäure durchgeführt und mit identischen Bedingungen analysiert. Das Elektropherogramm zeigte eindeutig die Aufkonzentrierung der drei Nukleinsäure-Injektionen in einem Signal. Die Peakflächen der drei Einzelinjektionen entsprachen exakt der Peakfläche der retardierten DNA. Damit wurde gezeigt, daß Makromoleküle an der

Membran im Mikrokanal elektrophoretisch immobilisiert und quantitativ remobilisiert werden können.

5 Nukleinsäure-Extraktion

Für die Nukleinsäure-Aufkonzentrierung ist es notwendig die vorhandene Nukleinsäure-Menge aus einer bestimmten Lösung möglichst quantitativ in den Mikrokanal zu überführen. Wenn die gesamte Nukleinsäure injiziert ist, dürfte bei einer 2. Injektion aus dem selben Probengefäß nur noch sehr wenig Nukleinsäure extrahierbar sein.

Um die DNA-Menge möglichst gering zu halten wurde die DNA mit dem interkalierenden Farbstoff YOYO (Molecular Probes) angefärbt und mit laserinduzierter Fluoreszenzdetektion (LIF) detektiert. Dazu wurde YOYO (0,4 mmol/l, in 76 µl TBE-Puffer) vorgelegt und mit 1-4 µl der pBr-DNA-Lösung (1 mg/l) versetzt und mindestens 30 min bei RT vor der Messung inkubiert. Die Meßparameter befinden sich in Tabelle 3.

20 **Tabelle 3:** Meßparameter zur elektrophoretischen Nukleinsäure-Extraktion

Spannung:	-10 kV für 10 min, dann + 10 kV für 10 min
Puffer:	Tris/Borat (100 mmol/l, pH 8,5)
Kapillare:	gecoatete Quarzkapillare, 75 µm Innendurchmesser, 57 cm Länge, 50 cm zum Detektor (Biorad, München)
Kapillarelektrophoresegerät:	PACE 5510 (Beckman, München)
Temperatur:	25°C
Detektion:	LIF (Argon) EX 488, EM 520 nm, Gain 100
Injektion:	2 x elektrokinetisch (60 min x -10 kV) aus 50 µl
Spülen der Kapillare vor der Injektion:	1. Wasser (1 min, 5×10^4 Pa) 2. Puffer (3 min, 5×10^4 Pa)

Die Detektionsprofile sahen so aus, daß nach ca. 10 min ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenz zu verzeichnen war, der rasch ein Plateau erreichte. Nach ca. 30 min fiel die Fluoreszenz wieder ab, verbunden mit einem allmählichen Anstieg des Stroms im Kanal. Die Höhe des Plateaus korrelierte mit der Menge an DNA. Bei der zweiten Injektion war aus keiner Probe noch signifikante Fluoreszenz zu injizieren. Die Daten belegen die vollständige Extraktion der pBr-DNA bei der 1. Injektion. Aus dem Fluoreszenzverlauf schließen wir, daß die gesamte Nukleinsäure bereits nach 30 min vollständig injiziert war.

Diese Daten zeigen eindeutig, daß die gesamte Nukleinsäure eines Probenvolumens elektrokinetisch in einen Mikrokanal injiziert werden kann. In Kombination mit der Größenausschlußmembran sollte es möglich sein diese Nukleinsäure in wenigen Nanoliter aufzukonzentrieren und so nachweisbar zu machen.

15

Nukleinsäure-Aufkonzentrierung

Mit den Meßbedingungen von Tab. 2 wurde Nukleinsäure in den Mikrokanal mit eingebauter Membran injiziert. Dazu wurde pBr-DNA (2,5 mg/l, 50 µl) 25 min injiziert und anschließend mit dem Trennpuffer fokussiert (Fig. 2). Bei dieser niedrigen Konzentration war die DNA direkt nicht nachweisbar. Nach 10 min wurde die Spannung umgepolt und die aufkonzentrierte DNA wanderte nach 12 min als intensiver Peak zurück durch den Detektor. Praktisch die gesamte DNA der 50 µl-Probe (0,1 mg) war in weniger als 50 nl (1 cm in der Kapillare) aufkonzentriert. Der Anreicherungsfaktor lag damit bei Faktor 1000.

Derivatisierung auf der Membran

Zur Überprüfung der Derivatisierung von Nukleinsäure an einer Größenausschlußmembran wurde pBr-DNA wie bereits beschreiben elektrokinetisch injiziert und auf der Membran immobilisiert (Tab. 2). Nach der Immobilisierung wurde die Spannung aber nicht sofort umgekehrt, sondern das zur DNA auf der anderen Seite der Mem-

- bran gelegene Puffergefäß wurde gegen eine Pufferlösung ersetzt, die kationischen interkalierenden Farbstoff enthielt (YOYO, 0,4 mmol/l, Molecular Probes). Die Spannung wurde für weitere 20 Minuten beibehalten, wobei der Farbstoff durch den Mikrokanal, und durch die Membran wanderte. Die DNA wurde also mit YOYO auf der Membran inkubiert. Danach wurde nochmals 10 min ohne Farbstoff elektrophoriert, um restliches YOYO wieder aus der Kapillare zu entfernen. Dann wurde die Spannung umgepolt und so die retardierte und angefärbte DNA wieder am Detektor vorbei bewegt.
- 10 Die elektrokinetisch injizierte DNA migrierte nach 2 min durch den UV-Detektor. Zwei Minuten nach der Umpolung konnte ein Signal mit größerer Peakfläche detektiert werden, das der angefärbten DNA entsprach. Die mittels Dioden-Array-Detektion (DAD) im Mikrokanal erzeugte UV-VIS-Spektrum der injizierten DNA zeigte das typische UV-Spektrum mit 2 Absorptionsmaxima bei 200 und 260 nm. Nach der
- 15 Inkubation mit YOYO auf der Membran wies die DNA zusätzlich ein Absorptionsmaximum bei 490 nm auf. Dies entspricht exakt dem Absorptionsmaximum der mit YOYO interkalierten DNA. Damit konnte bewiesen werden, daß Makromoleküle im Mikrokanal derivatisiert werden können.

20

Kopplung mit Elektronenmikroskopie

Als Beweis der weiteren Analyse von aufbereiteten Makromolekülen, soll die Kopplung mit der Elektronenmikroskopie (EM) dienen.

25

Herpes Simplex Viren (Typ 2) wurden mit YOYO (Molecular Probes) angefärbt und mit laserinduzierter Fluoreszenzdetektion (LIF) detektiert. Dazu wurde YOYO (0,4 mmol/l, in 76 µl TBE-Puffer) vorgelegt und mit 4 µl der HSV-2-Lösung (5×10^5 Viren/ml) versetzt und mindestens 30 min bei RT vor der Messung inkubiert. Die

30 Meßparameter befinden sich in Tabelle 3.

Die wenigen injizierten, interkalierten Viren (10 - 20) wurden als einzelne Signale detektiert. Zur Identifizierung der Signale wurde die gleiche Probe unter vergleich-

baren Elektrophoresebedingungen an einer Prince-CE (Lauerlabs) mit Nanofraktions-sammler (Probot, BAI-Instruments) analysiert. Das Ende des Mikrokanals wurde dabei zeitgesteuert auf unterschiedliche Elektronenmikroskopieträger fraktioniert und nach Negativkontrastierung mit Uranylacetat im EM untersucht.

5

In den erwarteten Fraktionen konnten intakte HSV-Partikel eindeutig nachgewiesen werden. Damit wurde am Beispiel von Viren erstmals gezeigt, daß Makromoleküle nach der elektrophoretischen Trennung für weitere Analysen als intakte Partikel zur Verfügung stehen.

10

Legenden zu Abbildungen

Fig. 1: Schematische Darstellung der Aufreinigungsapparatur. Ein Mikrokanal (1) mit eingebauter Membran (2) verbindet 2 Puffergefäße (3,4). Über eingebrachte Elektroden können diese Puffergefäße auf unterschiedliche Spannungspotentiale gebracht werden (5). Über eine Druckregelung können auch unterschiedliche Drücke angelegt werden (6). In (3) befindet sich die zu untersuchende Probe.

20

Fig. 2: Schematische Darstellung der Aufkonzentrierung. Das zu untersuchende Makromolekül wurde elektrokinetisch in den Mikrokanal (1) mit eingebauter Membran (2) injiziert. Das Probengefäß wurde bereits durch den Konzentrationspuffer (7) ersetzt. Die Makromoleküle wandern bis zur Membran und werden dort festgehalten.

25

Fig. 3: Schematische Darstellung der Probenmodifizierung. In den Reaktionsgefäße (8,9) befinden sich die Derivatisierungsreagenzien, die entweder elektrokinetisch und/oder mit Hilfe von Druck zu den aufkonzentrierten Makromolekülen gebracht werden.

30

Fig. 4: Schematische Darstellung eines on-line Analysenverfahrens. Das aufkonzentrierte und modifizierte Makromolekül wird elektrokinetisch

im Mikrokanal (1) an einem Detektorfenster (12) vorbei mobilisiert, so daß die spektroskopischen Eigenschaften analysiert und ausgewertet werden können (13).

5 Fig. 5: Schematische Darstellung der Fraktionierung des aufgereinigten Makromoleküls. Die aufkonzentrierte Probe wird in dem Probengefäß oder auf dem Analysentarget (14) aufgefangen und steht für weitergehende Analysen zur Verfügung.

10 Fig. 6: Schematische Darstellung der high-throughput Aufreinigungsapparatur. Eine Vielzahl von Mikrokanälen wird so angeordnet, daß sie mit dem Probenformat (z.B. Mikrotiterplatte) kompatibel sind. Die Membran (2) wird über das gesamte Format eingebracht und mit einem zweiten Mikrokanal-Array (15) verbunden. Die Vorgehensweise dieser multiplen Anordnung entspricht Fig. 1-5.

15

Fig. 7: Schematische Darstellung der Anreicherungsapparatur für schnelle Aufkonzentrierungen. Neben dem Mikrokanal (1) befindet sich ein Flachkanal (16), der mit dem Mikrokanal (1) über den Transferkanal (17) verbunden ist. Der Flachkanal erlaubt sehr viel höhere Flußraten und damit höhere Anreicherungsfaktoren. Details im Text.

20

Fig. 8: Schematische Darstellung der schnellen Anreicherung aus salzhaltiger Lösung in der Aufsicht am Beispiel von Nukleinsäuren. Die Anreicherung erfolgt durch Anlegen einer Spannung (6) an den Flachkanal (16) (Fig. 8a). Die Spannung wird so lange beibehalten, bis alle Nukleinsäuren an der Membranoberfläche (2) immobilisiert sind (Fig. 8b). Wird nun zwischen dem Flachkanal (16) und dem Mikrokanal (1), wie angegeben, eine Spannung (6) angelegt, so wandert die aufgereinigte und aufkonzentrierte Nukleinsäure von der großen Membranoberfläche des Flachkanals (16) zur Membran des Mikrokanals (1) (Fig. 8c) und steht dann für die analogen Verfahren (Fig. 3 -6) zur Verfügung. Details im Text.

25

30

Patentansprüche

1. Verfahren zur Isolierung und Aufkonzentrierung von Makromolekülen, dadurch gekennzeichnet, daß die Makromoleküle in einem Mikrokanal auf einer Membran elektrokinetisch gesammelt und anschließend analysiert werden.
5
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren, Viren, Proteine, Bakterien oder Pilze in einem Mikrokanal auf einer Membran elektrokinetisch gesammelt und anschließend analysiert werden.
10
3. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 und 2, wobei die Probe auf der Membran derivatisiert wird.
- 15 4. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 3 als Probenvorbereitung für weitere Analysenverfahren.
5. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 4 als Probenvorbereitung für MS, Gelelektrophorese, PCR, TEM, Nucleinsäuresequenzierung, Immundiagnostik und Hybridisierungen.
20
6. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens gemäß den Ansprüchen 1 bis 5 in Form eines Chip-Moduls mit eingebetteter Membran, wobei 1-400 Kapillaren nebeneinander angeordnet sind.
25
7. Vorrichtung gemäß Anspruch 2, enthaltend eine Membran aus Polyethersulfon (PES), Polyester, vliesgestütztem Acrylpolymer, Polytetrafluorethylen (PTFE), Polysulfon, Polypropylen (PP), Glasfaser, Nylon oder Polycarbonat.
- 30 8. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens gemäß den Ansprüchen 1 bis 7 in Form eines Flachkanals zur Analyse von salzhaltigen Proben.

9. Verwendung der Vorrichtung gemäß den Ansprüchen 6 bis 8 zur Anreicherung und zur Analyse von Makromolekülen.
10. Verwendung der Vorrichtung gemäß den Ansprüchen 6 bis 8 in der Qualitätskontrolle von biologischen Präparaten.
11. Verwendung der Vorrichtung gemäß den Ansprüchen 6 bis 8 zur direkten Infektionsdiagnostik.
12. Verwendung der Vorrichtung gemäß den Ansprüchen 6 bis 8 zur amplifikationsfreien Nukleinsäureanalytik.

Fig. 1

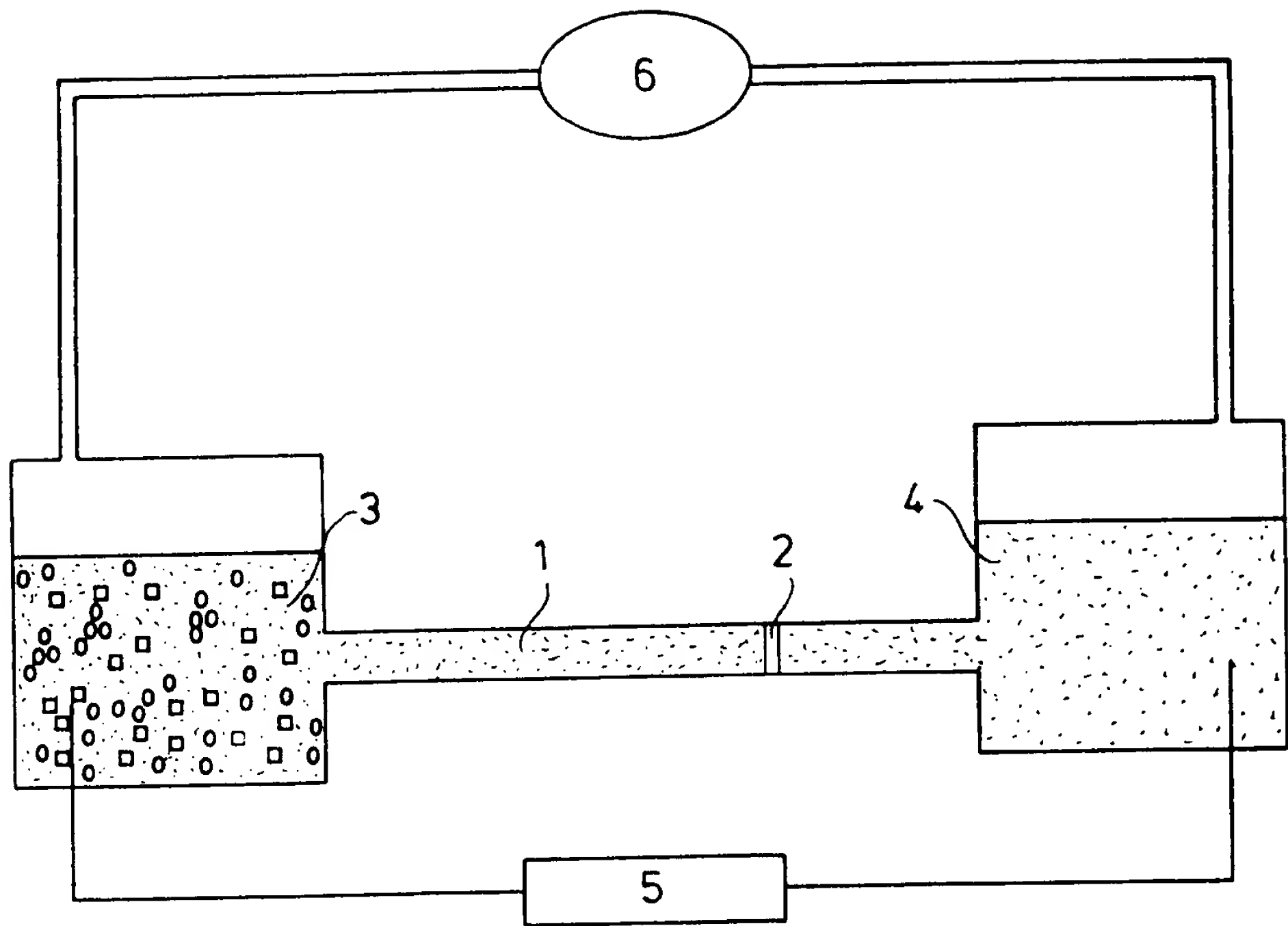


Fig. 2

2 / 5

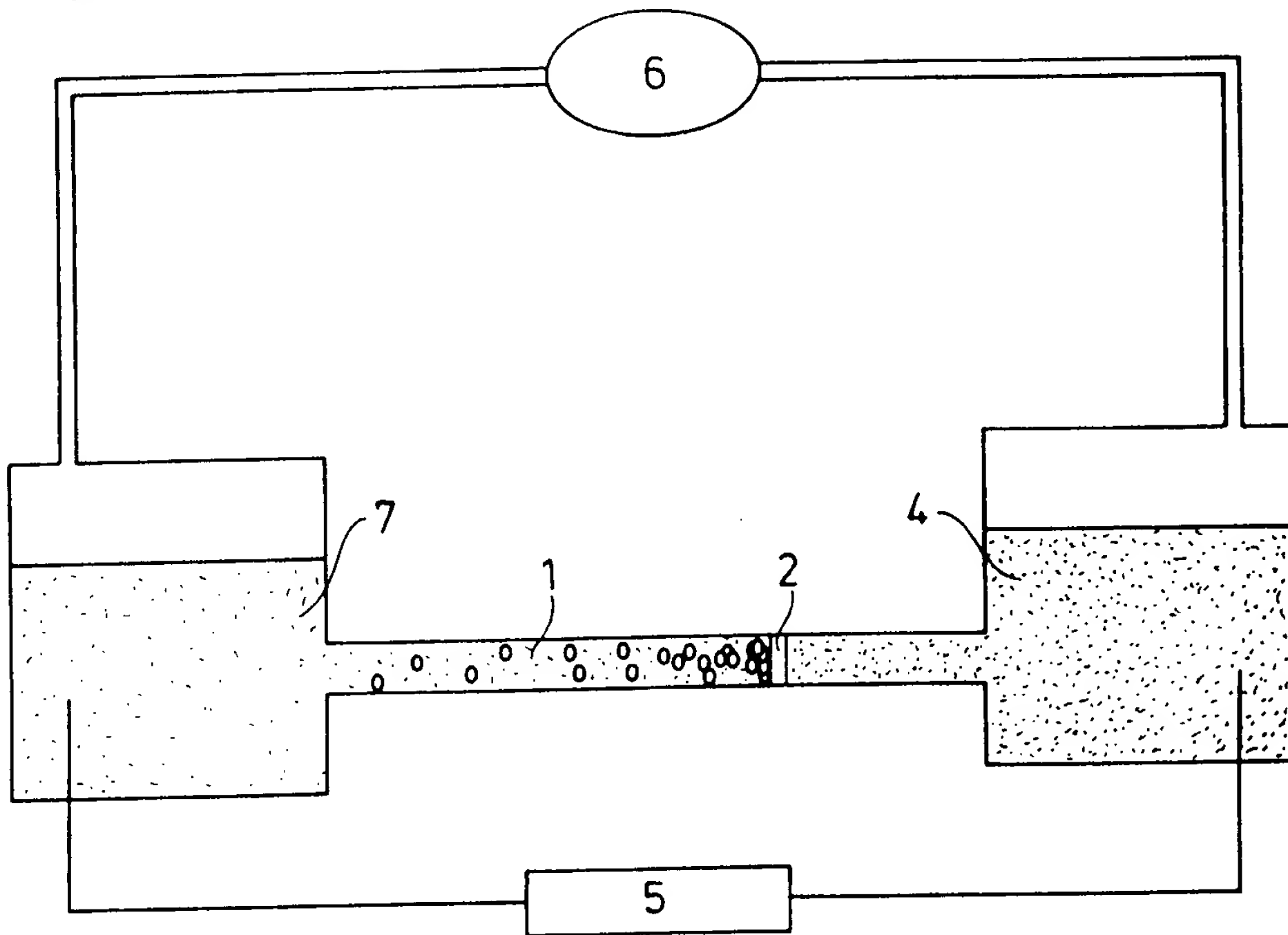


Fig. 3

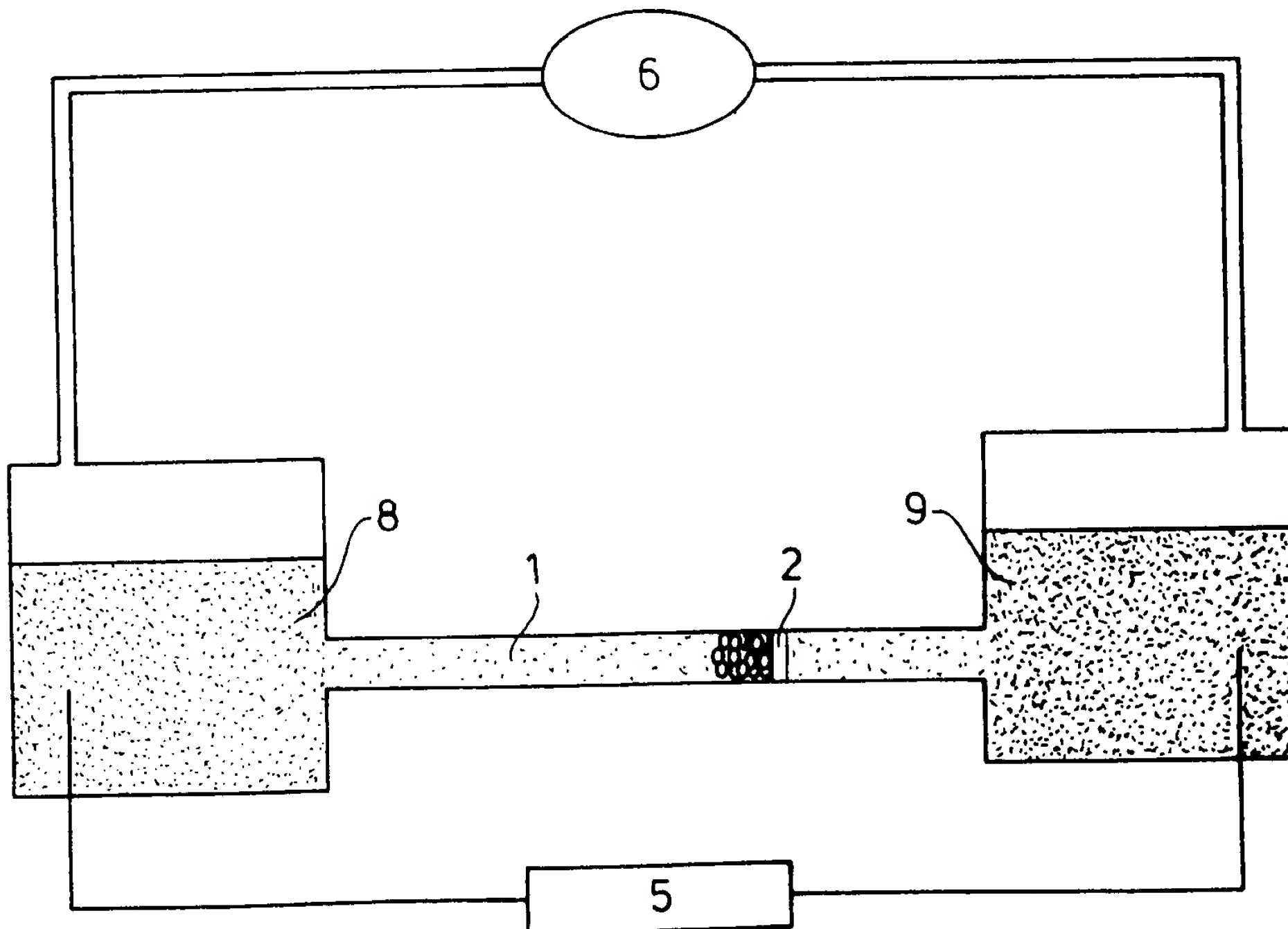


Fig. 4

3 / 5

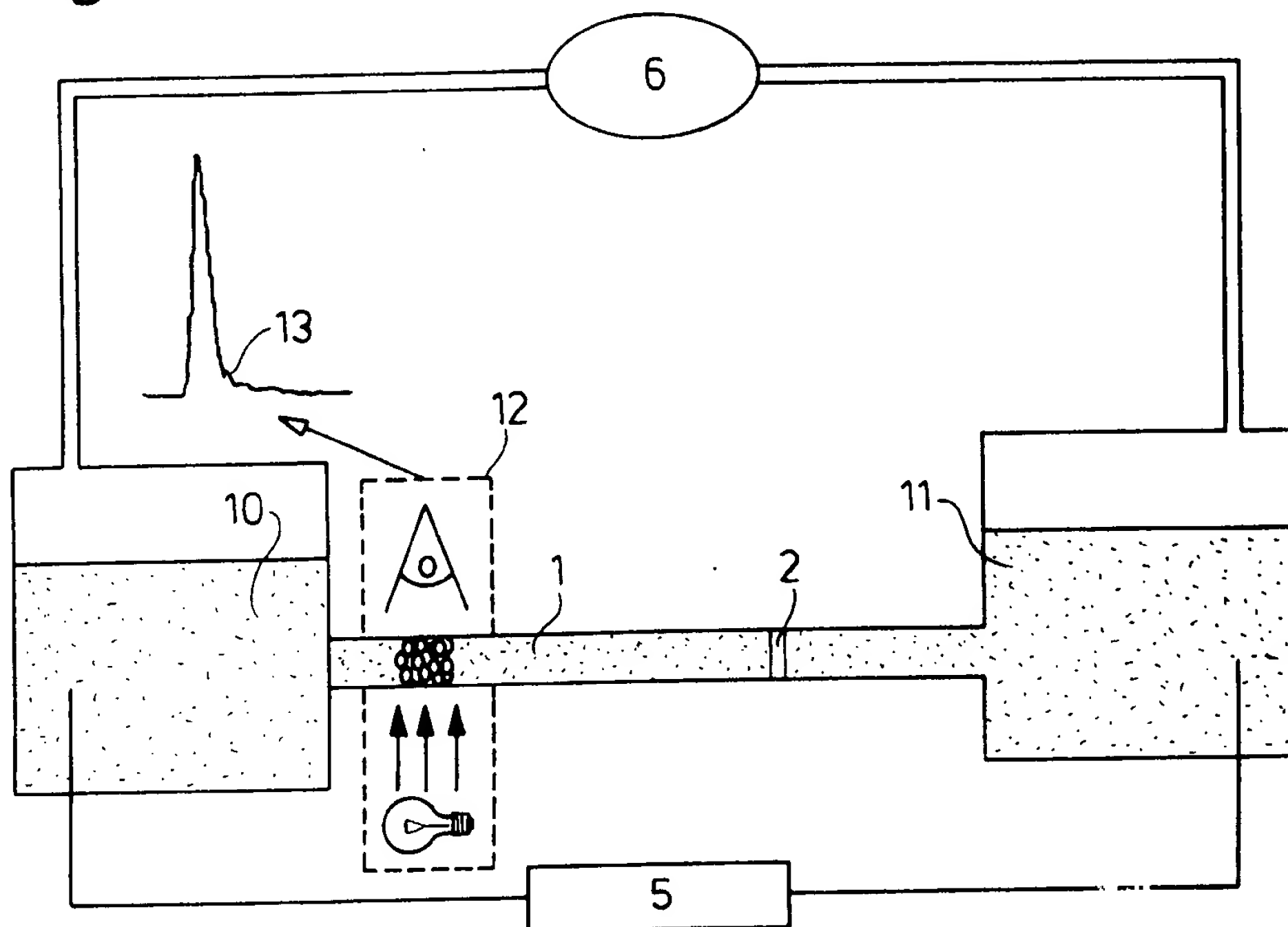


Fig. 5

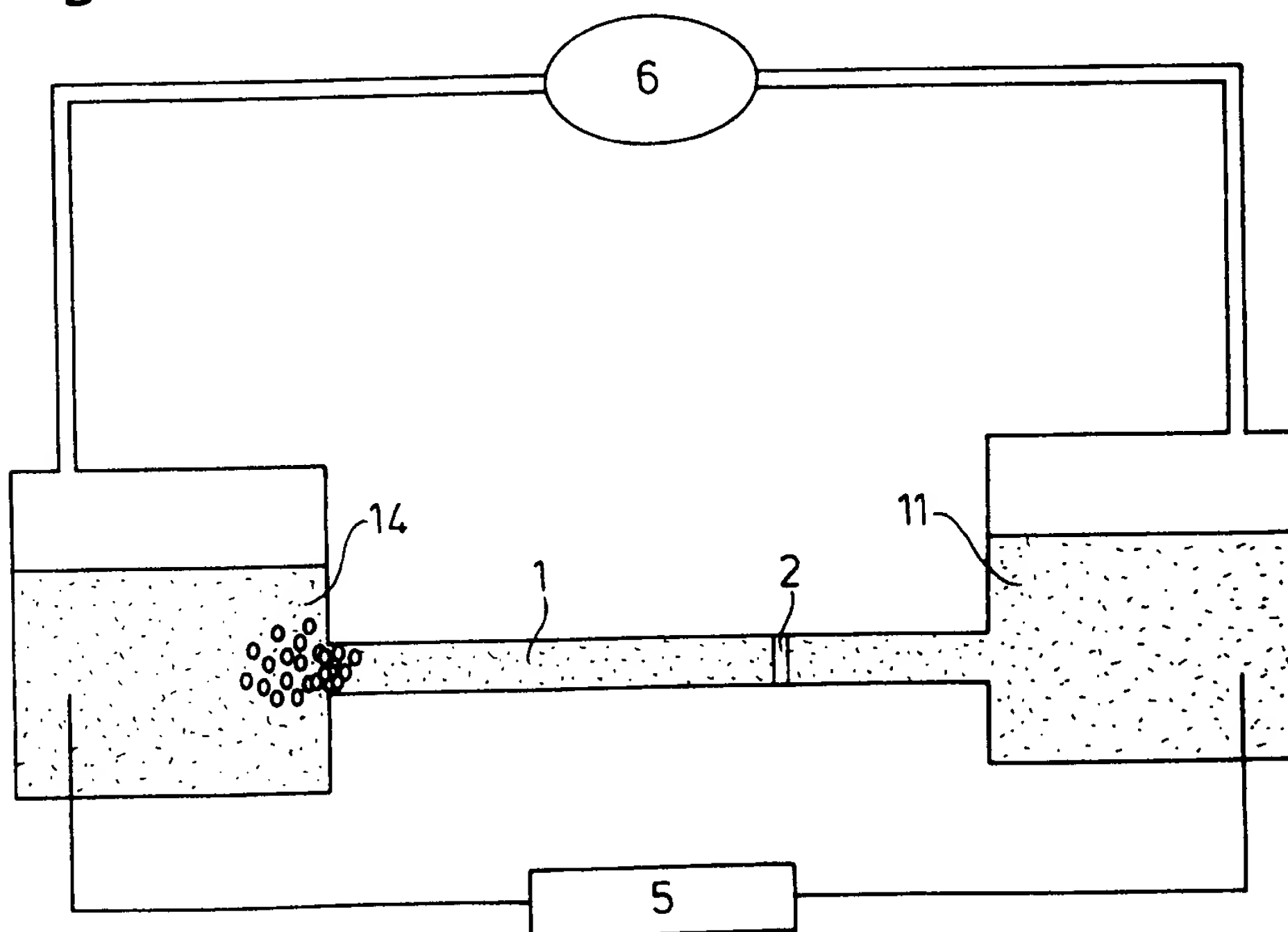


Fig. 6

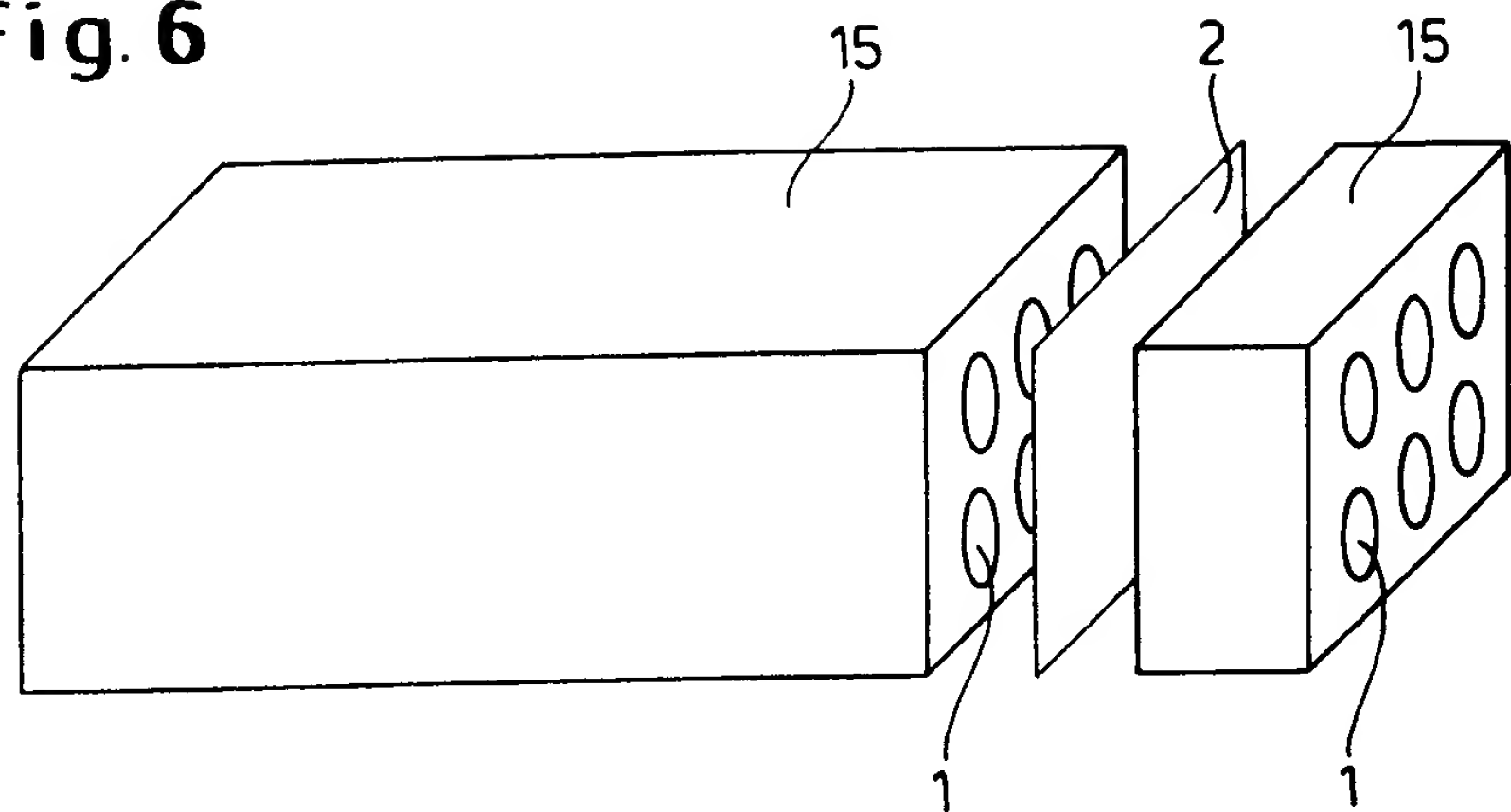
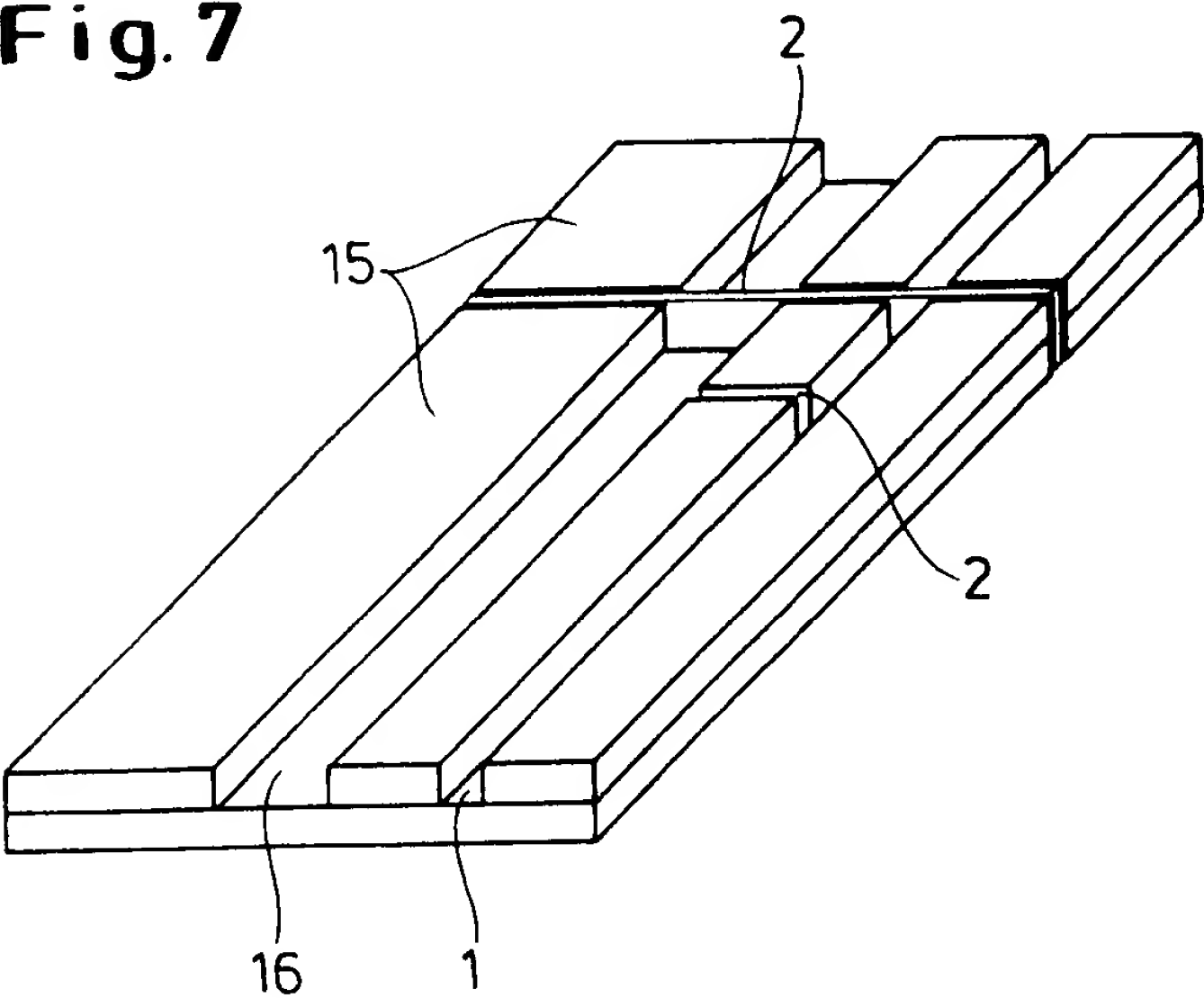
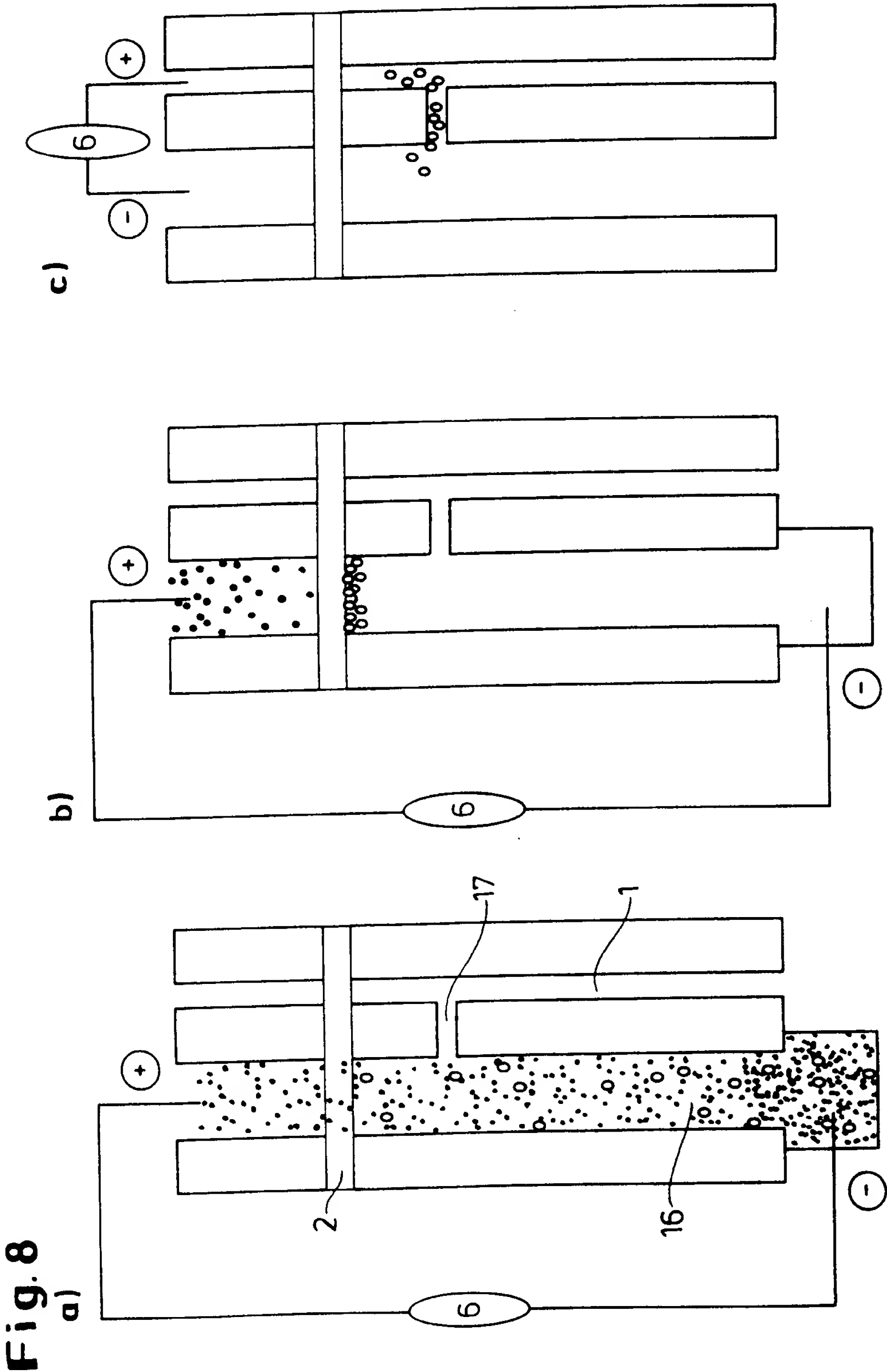


Fig. 7





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 97/07306

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07H1/08 G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07H G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 93 05390 A (GUZMAN NORBERTO A) 18 March 1993 cited in the application whole document, in particular page 2 paragraph 2 and figure 31.	1,6
A	BOROVETZ, HARVEY S. ET AL: "Protein adsorption in vitro onto biomaterial surfaces covered with ULTI carbon" BIOMATER., MED. DEVICES, ARTIF. ORGANS (1982), 10(3), 187-203 CODEN: BMDOAI; ISSN: 0090-5488, 1982, XP002060277 See abstract.	6

☐ Further documents are listed in the continuation of box C

☒ Patent family members are listed in annex

Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 April 1998

Date of mailing of the international search report

24/04/1998

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P B 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 apo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Riolo, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/07306

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
W0 9305390 A	18-03-93	US 5202010 A	13-04-93
		AU 661241 B	13-07-95
		AU 2640192 A	05-04-93
		CA 2120251 A	18-03-93
		EP 0666980 A	16-08-95
		MX 9204974 A	31-05-94
<hr/>			

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/07306

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07H1/08 G01N33/50

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07H G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 93 05390 A (GUZMAN NORBERTO A) 18. März 1993 in der Anmeldung erwähnt Ganzes Dokument; insbesondere Seite 2 Absatz 2 und Abbildung 31.	1,6
A	--- BOROVETZ, HARVEY S. ET AL: "Protein adsorption in vitro onto biomaterial surfaces covered with ULTI carbon" BIOMATER., MED. DEVICES, ARTIF. ORGANS (1982), 10(3), 187-203 CODEN: BMDOAI; ISSN: 0090-5488, 1982, XP002060277 siehe zusammenfassung. ---	6



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

" Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

7. April 1998

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

24/04/1998

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Riolo, J

INTERNATIONALER RECHNUNGENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Inte	nales Aktenzeichen
------	--------------------

PCT/EP 97/07306

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9305390 A	18-03-93	US 5202010 A	13-04-93
		AU 661241 B	13-07-95
		AU 2640192 A	05-04-93
		CA 2120251 A	18-03-93
		EP 0666980 A	16-08-95
		MX 9204974 A	31-05-94

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :
C07H 1/08, G01N 33/50

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/30571

not. sk

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum:

16. Juli 1998 (16.07.98)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP97/07306

(22) Internationales Anmeldedatum:

24. Dezember 1997
(24.12.97)

(30) Prioritätsdaten:
197 00 364.8

8. Januar 1997 (08.01.97)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BAYER
AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-51368 Leverkusen
(DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DÜRR, Hansjörg
[DE/DE]; Luisenstrasse 23a, D-51399 Burscheid (DE).
BRÜGGEMEIER, Ulf [DE/US]; 20 Apple Way, Madi-
son, CT 06443 (US). DIERKSEN, Karsten [DE/DE];
Neunkircher Strasse 16, D-51107 Köln (DE). HEHNEN,
Hans-Robert [DE/DE]; Am Trerichsweiher 19, D-53721
Siegburg (DE). NEUMANN, Rainer [DE/DE]; Olefstrasse
11, D-50937 Köln (DE). KUCKERT, Eberhard [DE/DE];
Am Scherfenbrand 67, D-51375 Leverkusen (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter:

BAYER AKTIENGE-
SELLSCHAFT; D-51368 Leverkusen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB,
GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW,
ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: ELECTROKINETIC SAMPLE PREPARATION

(54) Bezeichnung: ELEKTROKINETISCHE PROBENVORBEREITUNG

(57) Abstract

The invention concerns a method which enables macromolecules (nucleic acids, proteins, viruses and bacteria) to be isolated from biological materials, such as blood, serum, fluid, urine, plants, cells, supernatant liquor from cells, etc. and preparations thereof, concentrated and rendered accessible to analysis. The macromolecules are first electrokinetically concentrated in a flat duct on a membrane. The concentrated macromolecules can be transferred electrokinetically via a transfer duct into an analytical micro-duct for further processing.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren, daß es erlaubt, Makromoleküle (Nukleinsäuren, Proteine, Viren und Bakterien) aus biologischen Materialien, wie Blut, Serum, Liquor, Urin, Pflanzen, Zellen, Zellüberständen etc. und Aufbereitungen daraus, zu isolieren, aufzukonzentrieren und analytisch zugänglich zu machen. Die Makromoleküle werden zunächst in einem Flachkanal an einer Membran elektrokinetisch aufkonzentriert. Die aufkonzentrierten Makromoleküle können elektrokinetisch über einen Transferkanal in einen analytischen Mikrokanal zur weiteren Prozessierung überführt werden.

Le A 32145

Elektrokinetische Probenvorbereitung

Biologische Makromoleküle wie z.B. Proteine und Nukleinsäuren, aber auch kleine Teilchen wie Viren und Bakterien sind sowohl diagnostisch, als auch für die medizinische Forschung, von großer Bedeutung.

Die etablierten Verfahren zur Charakterisierung dieser Substanzen aus biologischen Matrices sind z.T. sehr aufwendig. So wird beispielsweise für Nukleinsäure-Analysen die Target-Nukleinsäure isoliert, anschließend amplifiziert und mit einem geeigneten Analysenverfahren ausgewertet. Die Isolierung ist zeitaufwendig und schwierig zu automatisieren. Um ausreichende Mengen Nukleinsäure für die etablierten Analysenverfahren zu erhalten, muß die Nukleinsäure in einem weiteren Schritt durch Amplifikation vervielfältigt werden. Breitere Anwendung hat hier bisher nur die Polymerase Kettenreaktion (PCR) gefunden.

Mit der „Elektrokinetischen Probenvorbereitung“ kann die gesamte Nukleinsäure-Analytik von der Isolierung bis zur Auswertung, auch unter Vermeidung der zusätzlichen Amplifikation, mit bisher nicht gekannter Schnelligkeit und Automatisierung durchgeführt werden.

Aufreinigung und Diagnose von Proteinen

Da unterschiedliche Proteine individuelle physikalische Eigenschaften haben, gibt es keine universell anwendbaren Verfahren zur Aufreinigung. Anwendung finden überwiegend chromatographische und elektrophoretische Verfahren, Fällungen, Ultrafiltration, Ultrazentrifugation und die Größenausschlußchromatographie (Doonan, S., *Methods Mol. Biol.*, 1996, 59, Totowa, N.J., Humana, 1996, 405ff). Für diagnostische Anwendungen haben sich immunologische Verfahren durchgesetzt, die das Zielprotein über spezifische Antikörpererkennung nachweisen.

Aufreinigung und Diagnose von Nukleinsäuren

Um aus biologischen Material, für diagnostische Anwendungen, Nukleinsäuren zu isolieren, sind, je nach Beschaffenheit des Materials, unterschiedliche Aufschlußverfahren und anschließende Reinigungsverfahren nötig. Dabei muß wiederum gewährleistet sein, daß die zu isolierende Nukleinsäure nicht zerstört wird. Insbesondere RNA kann leicht durch ubiquitäre RNAsen degradiert werden, so daß der Zusatz von Inhibitoren für diese störenden Enzyme nötig ist (Walker, J.M., *Methods Mol. Biol.*, 1984, 2, Clifton, N.J., Humana, 1984, 113ff). Im folgenden werden die zur Zeit üblichen Verfahren umrissen:

Ein einfacher Fall für die Gewinnung von Nukleinsäure ist die Isolierung aus einer reinen Bakterienkultur: Im Falle von E. coli setzt alkalische Lyse die Nukleinsäure frei; nach Zentrifugation und Neutralisation kann dieses Rohprodukt direkt für PCR Ansätze verwendet werden (Rolfs, A. et al. PCR: Clinical Diagnosis and Research, Berlin, Springer, 1992).

In der Regel ist das Probenmaterial für die medizinische Diagnostik aber heterogener aufgebaut; Blut, Urin, Liquor, Abstrichmaterial, Sputum, Gewebeproben, Faeces, z.B. verlangen nach spezifischen Aufschlußmethoden, die wiederum je nach Fragestellung (Detektion von Bakterien, Pilzen, Viren oder genomischer Nukleinsäure aus dem Trägerorganismus) modifiziert werden müssen.

Nachfolgend eine kurze Zusammenfassung der gängigsten Aufreinigungsverfahren für diese Proben:

Phenolextraktion der Nukleinsäure mit Proteinase K-Behandlung.

Retardierung der Nukleinsäure an Membranfilter; wird aufgrund der Verstopfungsproblematik nur für vorgereinigte Proben oder gering belastete Proben - wie Urin - angewandt.

5 Festphasen, an die Nukleinsäuren gebunden werden können, ermöglichen Trennungen von Stör- und Begleitsubstanzen durch Waschschritte. Beispiele hierfür sind: a) Adsorption an Glasmilch in Natriumjodidpuffer (Maiwald, M. et al., *BIOforum* 1994, 17, 232-237.). b) Anlagerung der negativ geladenen Nukleinsäure an schwach basische Polymere (EP 0707077 und US 5434270). c) Zellulosematrizes zur direkten Absorption von Blut, worauf dann alle Behandlungsschritte inklusive Nukleinsäurefreisetzung und Aufreinigung erfolgen. (Del Río, S.A. et al. *Biotechniques*, 1996, 20, 970-974). d) Silicamikropartikel, welche auch in Membranen eingebettet sein können, können ebenfalls zur Nukleinsäure-Aufreinigung eingesetzt werden (WO 95/34569). Ionen-

10 austauschermembranen (US 832284) oder chemisch modifizierte Silica-Phasen (EP 0648777) gehören ebenfalls zu dieser Gruppe.

15 Es sind auch Elektroelutionsapparaturen im Markt (z.B. von Biometra), um makroskopisch Proteine, Nukleinsäuren oder Viren aus Gelen zu extrahieren (EP 380357).

Um ausreichende Mengen an Nukleinsäure zu erhalten, schließt sich an die Isolierung der Nukleinsäuren üblicherweise ein Amplifikationsschritt an (EP 229701).

20 Ansätze zur Automation der Nukleinsäure-Analytik gibt es in Form der Anionenaustauschchromatographie und der Nukleinsäure-Adsorption mit Pipettierrobotern (BioRobot von Quiagen). In einem japanischen Patent wird die Nukleinsäure in einer Kapillare immobilisiert, um darin die Amplifikation durchführen zu können (JP 7107962).

25

Aufreinigung und Diagnose von Viren

30 Viren werden üblicherweise mit folgenden Verfahren isoliert und aufkonzentriert: Ultrazentrifugation, Elektroextraktion, Größenausschlußtrennung, Affinitätschromatographie und Fällung (Polson, Alfred, *Prep. Biochem.*, 1993; 23, Dekker, New York, N. Y., 1993). Für diagnostische Zwecke werden entweder immunologische Verfahren

auf die Proteinhülle oder nukleinsäureanalytische Verfahren nach Freisetzung der viralen Nukleinsäuren eingesetzt.

5 **Aufreinigung und Charakterisierung von Bakterien**

10 Bakterien werden üblicherweise durch Austreichverfahren auf Nährmedien vereinzelt und hochgezogen. Für die Isolierung und Charakterisierung stehen immunologische Verfahren - z.B. durch Fluoreszenzmarkierung - , Nukleinsäurebestimmungsmethoden - nach Zellyse - zur Verfügung.

15 Alle Verfahren, unabhängig vom Makromolekül, sind zeitaufwendig, beinhalten zahlreiche Verdünnungsschritte und gewährleisten häufig nicht die Abtrennung von Störfaktoren. Im nachfolgenden soll der technische Stand der Mikrokanaltechnologie und der amplifikationslosen Nukleinsäure-Analytik kurz skizziert werden.

Mikrokanäle

20 Die Kapillarelektrophorese ist eine relativ junge analytische Trenntechnik (St.Claire R.L., *Anal. Chem.* 1996, 68, 569R-586R). Das Prinzip beruht auf der Trennung von Analyten in einer elektrolytgefüllten Kapillare durch Anlegen eines Hochspannungsfelds zwischen den Kapillarenden.

25 Kapillarelektrophoretische Analysenverfahren werden seit mehreren Jahren zur Analyse von biologischen Makromolekülen wie Proteinen (WO 93/22665), Nukleinsäuren (Heller, C., *J. Chromatogr. A*, 1995, 698, 19-31) und neuerdings auch Viren (DE 4438833) eingesetzt. Die Detektion erfolgt entweder direkt mit UV oder mittels Fluoreszenzdetektion nach Markierung der Makromoleküle (Pentoney, S.L., Jr., et al. *Handbook of Capillary Electrophoresis*, S.147, Landers, J.P. (Ed.) Boca Raton, CRC Press, 1994). Fast alle Gerätehersteller bieten Analysenkits für die Nukleinsäure-Analyse mit der CE an. Seit 1995 gibt es auch einen vollautomatischen Nukleinsäure-

30

Analysator auf Basis der CE, den ABI Prism 310 von Perkin-Elmer (Applied Biosystems). Die Injektion der Nukleinsäure in die Kapillare erfolgt üblicherweise elektrokinetisch durch Anlegen einer Spannung. Die elektrokinetische Aufgabemenge ist aber limitiert, da sonst Peakverbreiterung und Probendiskriminierung auftritt
5 (Butler, J.M., et al. *J. Chromatogr. B*, 1994, 658, 271-280).

Durch Einführung der laserinduzierten Fluoreszenzdetektion in die Kapillarelektrophorese (St.Claire R.L., *Anal. Chem.* 1996, 68, 569R-586R), die von Beckman auch bereits kommerzialisiert ist, gelang eine deutliche Empfindlichkeitssteigerung. Damit
10 lassen sich auch intakte Viren mittels CE analysieren (DE 4438833). Proteine können nur nach spezifischer Modifikation mit Fluoreszenz detektiert werden.

Aufkonzentrierung im Mikrokanal

Ein prinzipieller Nachteil der CE ist das geringe Injektionsvolumen, das nur wenige Nanoliter beträgt. Es gibt eine Vielzahl von Versuchen diesen Nachteil zu kompensieren (St.Claire R.L., *Anal. Chem.* 1996, 68, 569R-586R). Dazu gehören isotachophoretische Aufkonzentrierung und Stacking die beide zu einer Fokussierung der Probenbestandteile im Injektionsvolumen führen. Von Guzmán wurde 1993 eine spezifische Festphasenadsorption in der Kapillare zur Probenaufkonzentrierung zum Patent angemeldet (WO 93/05390). Durch spezifische molekulare Wechselwirkung werden
20 spezielle Verbindungen einer Probe festgehalten oder durchgelassen. Eine Weiterentwicklung dieser Verfahren wurde von Tomlinson et al. mit der membrane preconcentration capillary electrophoresis gemacht (Tomlinson, A.J., et al. *J. High Res. Chromatogr.* 1995, 18, 381-383). Durch Einführen einer Umkehrphasenmembran in die Kapillare werden lipophile Probenbestandteile in einer Festphasenextraktion in der Membran festgehalten, anschließend mit einem organischen Lösungsmittel durch die Membran eluiert und kapillarelektrophoretisch
25 getrennt.
30

CE-Chips

5 Capillary Array Electrophoresis wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen, hauptsächlich für die Nukleinsäure-Sequenzierung, entwickelt und zum Teil auch zum Patent angemeldet (WO 96/04547). In photolithographisch hergestellte Mikrokapillarsystemen wurden fluoreszierende Moleküle spannungsabhängig gesteuert und analysiert.

10 Ebenfalls auf Basis der Chiptechnologie wurden Mikromaschinen patentiert, die durch ein Netzwerk von Kanälen und elektrischen Schaltern eine Prozesssteuerung von Lösungen zu synthetischen oder analytischen Zwecken möglich macht (WO 96/15450).

Amplifikationsfreie Nukleinsäure-Analysen

15 Auf Basis der hohen Empfindlichkeiten der Fluoreszenzdetektion wurde die Durchflußzytometrie zur single molecule detection zum Patent angemeldet (WO 90/14589).

20 Die Fluoreszenzkorrelations Spektroskopie wurde ebenfalls für biologische Screeningverfahren über single molecule detection eingesetzt (EP 731173). Auch High Throughput Nukleinsäure-Sequenzierung wird auf Basis dieser Technologie bearbeitet (Harding, J.D., et al. *Trends in Biotechnology*, 1992, 10, 55-57). Diese Verfahren beruhen auf dem Nachweis eines einzelnen Fluoreszenzmoleküls in einem sehr kleinen Volumenelement.

25 Mit der vorliegenden Erfindung sollte ein automatisiertes Verfahren entwickelt werden, das es erlaubt Makromoleküle (Nukleinsäuren, Proteine, Viren und Bakterien) aus biologischen Materialien, wie z.B. Blut, Blutplasma, Serum, Liquor, Urin, Gewebeproben, Pflanzen, Zellen, Zellüberständen etc. und Aufbereitungen daraus, zu isolieren, aufzukonzentrieren und analytisch zugänglich zu machen.

30 Der zentrale Bestandteil des Probenvorbereitungsmoduls ist ein thermostatisierbarer Mikrokanal mit einer eingebrachten Membran. Dieser, mit einer leitenden Flüssigkeit gefüllte Kanal, steht auf beiden Seiten in Kontakt mit auswechselbaren oder fest

installierten Gefäßen. Durch das Anlegen einer Potentialdifferenz zwischen den Probengefäßen können geladene Moleküle elektrophoretisch mobilisiert werden. Durch die Möglichkeit eine Druckdifferenz anzulegen kann zusätzlich ein laminarer Fluß im Mikrokanal erzeugt werden. Eine vereinfachte schematische Darstellung befindet sich in Fig. 1-5.

In einem Mikrokanal (1) wird eine Membran (2) eingebracht die geeignet ist das gewünschte Makromolekül zurückzuhalten. Durch Anlegen einer Druckdifferenz (6) und/oder einer Spannung (5) an die Enden des Mikrokanals (3,4) wird ein Teil der Probe in den Kanal injiziert (Fig. 1). Die Injektion wird so lange fortgesetzt bis sich eine ausreichende Menge des gewünschten Makromoleküls im Mikrokanal befindet. Durch die Kombination der Parameter pH-Wert, Membraneigenschaften, Beschaffenheit des Mikrokanals, Polarität der Spannung und Richtung des Druckgradienten kann die Injektion auf das gewünschte Zielmolekül abgestimmt werden, so daß entweder nur das gewünschte Makromolekül in den Kanal gelangt oder durch die Membran festgehalten wird.

Der Mikrokanal hat einen Innendurchmesser von 10 - 100 µm und eine Gesamtlänge von 3 - 50 cm. Der Mikrokanal wird aus einem elektrisch nichtleitendem Material wie Polymer, Keramik, Glas oder Quarz gefertigt. Es sind prinzipiell alle synthetischen Polymere geeignet. Das Polymer muß inert gegenüber den eingesetzten Pufferlösungen sein und ist idealerweise durchlässig für optische Detektionsverfahren (z.B. Polycarbonat, Polyesteracrylat, Polymethacrylat, Polyurethan, Polyacrylamid) aber auch PTFE ist geeignet. Um günstige Oberflächeneigenschaften zu erhalten kann der Kanal innen mit einem Polymer beschichtet werden (z.B. Polyacrylamid, Silanol oder Polyvinylalkohol).

Unabhängig vom Typ des untersuchten Makromoleküls können Membranen eingesetzt werden die nach dem Größenausschlußprinzip arbeiten (Ultrafiltrationsmembran). Der Größenausschlußbereich muß der Molekülgröße des Makromoleküls angepaßt werden. Die Spannweite der Membranen reicht von M_w 3000, für kleine Proteine oder Nukleotide, über Größenausschlußbereiche im unteren nm-Bereich, für große Nukleinsäuren und Viren, bis hin zu 0,45 µm, für Bakterien und Zellen. Bei

den Membranen handelt es sich um mikrostrukturierte Polymere, vorzugsweise um Polyethersulfon (PES), Polyester, vliesgestütztem Acrylpolymer, Polytetrafluorethylen (PTFE), Polysulfon, Polypropylen (PP), Glasfaser, Nylon oder Polycarbonat. Zusätzlich können Ionenaustauschmembranen und Adsorptionsphasen eingesetzt werden. Die Wahl dieser Membranen richtet sich aber nach der Art des Makromoleküls und wird daher individuell behandelt.

Nach optimalem Wechsel des Probengefäßes (3) gegen ein Konzentrationspuffergefäß (7) wird das injizierte Makromolekül durch Anlegen einer Druckdifferenz (6) und/oder einer Spannung (5) vor oder in der Membran (2) aufkonzentriert (Fig. 2). Das gewünschte Makromolekül befindet sich dann in einem Volumen von wenigen Nanolitern.

Nach optimalem Wechsel der Gefäße (4,7) gegen die Reagenziengefäße (8,9) können die dort enthaltenen Lösungen, oder Bestandteile daraus, durch Anlegen einer Druckdifferenz (6) und/oder einer Spannung (5) in den Mikrokanal (1) gebracht werden (Fig. 3). Die Bedingungen werden so gewählt, daß das Zielmolekül dabei aufkonzentriert bleibt. Das Zielmolekül kann auf diese Weise enzymatisch oder chemisch modifiziert, und/oder durch Hybridisierung bzw. immunologische Erkennung spezifisch erkannt werden. Die Thermostatisierbarkeit des Mikrokanals (1) und die Möglichkeit die Reagenziengefäße mehrfach zu wechseln erlaubt komplexe Umsetzungen und zyklische Prozesse. In diesem Modifizierungsschritt werden auch eventuell notwendige Derivatisierungsreaktionen für eine Fluoreszenz, Chemielumineszenz oder laserinduzierte Fluoreszenzdetektion durchgeführt.

Die erforderlichen Reaktionstemperaturen werden durch Thermostatisierung des Mikrokanals (1) erreicht. Dazu wird entweder entsprechend temperierte Luft oder Flüssigkeit am Mikrokanal vorbeigeleitet. Die Wandstärke des Mikrokanals wird dabei so gewählt, daß ausreichende Wärmeabfuhr gewährleistet ist.

Nach optimalem Wechsel der Reagenziengefäße (8,9) gegen die Puffergefäße (10,11) wird das Zielmolekül, durch Anlegen einer Druckdifferenz (6) und/oder einer Spannung (5) mobilisiert (Fig. 4). Durch optische Detektionsverfahren (12), wie

Absorption oder Fluoreszenz, kann das Molekül direkt im Mikrokanal (1) analytisch bestimmt werden (13). Es stehen die analogen Detektionsverfahren wie in der CE zur Verfügung (St.Claire R.L., *Anal. Chem.* 1996, 68, 569R-586R).

5 Dazu wird der Mikrokanal entweder komplett oder an einer Stelle transparent für optische Strahlung gemacht. Dazu muß die Transmission der Anregungsstrahlung und der Fluoreszenzstrahlung gewährleistet sein. Vorzugsweise handelt es sich um die eingangs erläuterten nichtleitenden Materialien. Die Fluoreszenzstrahlung wird in einem definierten Winkel von 0-180° senkrecht oder in Reflexion zur Einstrahlwellenlänge
10 gemessen. Vorzugsweise wird bei 45° oder 90° eingestrahlt.

Das hochkonzentrierte Analysentarget steht aber auch für weitergehende Analysen zur Verfügung (Fig. 5). So kann das Zielmolekül in das Analysengefäß (14) oder in oder auf ein beliebiges anderes Analysentarget fraktioniert werden.

15 Im Analysengefäß (14) befinden 1-1000 ml eines für die weitere Analyse geeigneten Puffers. Beispielsweise handelt es sich um PBS-Puffer, Tris/Borat oder einen Tris-Glycin-Puffer. Bei dem Analysengefäß (14) kann es sich auch um ein planares Analysentarget handeln, beispielsweise um einen massenspektrometrischen
20 Probenträger. Der elektrische Kontakt wird entweder direkt über das leitende Analysentarget erreicht oder durch Benetzung der Oberfläche zwischen Elektrode und Mikrokanal mit einer elektrisch leitenden Flüssigkeit.

25 Wird der Kanal zusätzlich verzweigt kann das aufkonzentrierte Zielmolekül durch Umschalten von Druck oder Spannung in weitere Kanäle für weitergehende Analysen oder Umsetzungen gebracht werden und ist daher direkt kompatibel mit der CE-Chip-technologie (WO 96/04547).

30 Fraktionierte Makromoleküle können mit allen denkbaren Verfahren weiter analysiert werden. Das hochkonzentrierte Makromolekül wird in weniger als einem Mikroliter eluiert und kann direkt in geeignete flüssige Matrices oder auch auf feste Probenträger aufgebracht werden.

Eine schematische Darstellung des parallelen Aufbaus befindet sich in Fig. 6. Die Mikrokanäle (1) werden aus nichtleitenden Materialien, wie Polymer, Keramik, Glas, Quarz oder Keramik (15) hergestellt und gegebenenfalls beschichtet. Die Kanalblöcke werden mit einer Membranzwischenschicht (2) zusammengefügt, so daß die Kanäle an der Membran aufeinanderstoßen. Die Anordnung der Kanäle richtet sich nach dem Probenformat. Nicht dargestellt sind die nachfolgenden Zusatzeinrichtungen. Zur Abfuhr der Joulschen Wärme werden gegebenenfalls zusätzliche Thermostatisierelemente eingeführt. Die Kanäle werden an den Enden so verjüngt, daß Sie in jeweiligen Gefäße eingeführt werden können oder sind dicht mit fest installierten Gefäßen verbunden. Für den elektrischen Kontakt werden, entweder an den Kanalenden oder in den Gefäßen, Elektroden angebracht und mit einer Hochspannungsquelle versorgt.

Für die Thermostatisierung werden beispielsweise Kanäle in den Analysenblock gelegt, die senkrecht zur Richtung und zwischen den Ebenen der Mikrokanäle liegen. Durch diese Kanäle kann entsprechend temperierte Luft oder Flüssigkeit gepumpt werden.

Für eine deutlich schnellere Aufkonzentrierung der Proben wurde eine parallele Kapillaranordnung entwickelt. Die schematische Darstellung dieses Moduls befindet sich in Fig. 7. Neben dem Mikrokanal (1) befindet sich der deutlich breitere Kanal (16). Die Höhe des Kanals entspricht der Dimension des Mikrokanals (10-100 µm), so daß die Joulsche Wärme nach wie vor gut abgeführt werden kann. Die Breite des Kanals (100 µm bis 10 mm) erlaubt aber Flüsse die um bis zu 10^3 höher liegen als im Mikrokanal (1). Die Membran wird zwischen die Modulblöcke (15) eingespannt. Das gesamte Modul ist damit 3 bis 10 cm lang, 1 bis 50 mm breit und 0,1 bis 50 mm stark. Die Kanalenden sind wiederum entweder mit austauschbaren oder fest installierten Probengefäßen verbunden. Durch parallele Anordnung kann auch ein analoger Aufbau wie in Fig. 6 erreicht werden. Die Makromoleküle werden im Kanal (16) aufkonzentriert und dann über den Transferkanal (17) in den Mikrokanal überführt und analog den Verfahren aus Fig. 1-6 weiter bearbeitet. Die schematische Anreicherung von Makromolekülen mit dieser schnellen Aufkonzentrierung ist am Beispiel von Nukleinsäuren nachfolgend beschrieben.

Die Anreicherung von Nukleinsäure aus salzhaltiger Lösung erfolgt durch Anlegen einer Spannung an den Flachkanal (16) (Fig. 8a). Neben dem Überschuß an kleinen Anionen (kleine schwarze Kugeln) wird auch die Nukleinsäure aus der Probe injiziert. Die anionischen Moleküle wandern durch die Membran (2) und werden damit von der Nukleinsäure entfernt. Die Spannung wird so lange beibehalten, bis alle Nukleinsäuren an der Membranoberfläche immobilisiert sind (Fig. 8b). Wird nun zwischen dem Flachkanal (16) und dem Mikrokanal (1), wie angegeben eine Spannung angelegt, so wandert die aufgereinigte und aufkonzentrierte Nukleinsäure von der großen Membranoberfläche des Flachkanals (16) zur Membran des Mikrokanals (Fig. 8c) und steht anschließend für die weitere Behandlung und Analyse (Fig. 3-6) zur Verfügung. Bei diesem Transferschritt können auch simultan Modifizierungsreaktionen am aufkonzentrierten Makromolekül durchgeführt werden.

1. Beschreibung der Nukleinsäuren-Aufkonzentrierung

1.1. Nukleinsäure wird mit einem geeigneten, etablierten Verfahren (Lyse, Hydrolyse, Ultraschall, etc.) aus der zu untersuchenden Probe freigesetzt und mit einem geeigneten sauren Extraktionspuffer versetzt. Der Puffer muß so konzipiert sein, daß nichtnukleotidische Bestandteile der Lösung keine anionische Überschußladung tragen. Unterhalb eines pH-Werts von ca. 5 zeigen Proteine keine negative Überschußladung mehr. Es können anorganische Säuren wie Salzsäure, Phosphorsäure oder Schwefelsäure wie auch organische Phosphorsäurederivate oder Sulfonsäuren eingesetzt werden. Vorzugsweise wird aber ein polymergebundener, saurer Ionenaustauscher (z.B. Polystyrolsulfonsäure) eingesetzt. Durch Verwendung des Ionenaustauschers wird der saure pH-Wert erreicht ohne zusätzlich Anionen in die Lösung einzuführen. Die elektrokinetische Nukleinsäure-Extraktion wird dadurch begünstigt.

1.2. Die Nukleinsäure wird aus dieser sauer gepufferten Lösung elektrophoretisch extrahiert. Dazu wird in die Lösung eine Elektrode eingeführt und auf kationisches Potential gebracht. Die Elektrode im Puffergefäß (4) (Fig. 1) wird auf anodisches Potential gebracht und der

5 Mikrokanal (1) wird mit einer elektrisch leitenden Flüssigkeit gefüllt. Die Zusammensetzung des Elektrolyts richtet sich nach der Art der Immobilisierungstechnik. Vorzugsweise handelt es sich um einen wäßrigen Puffer auf Borat-, Phosphat- oder Citrat-Basis. Auch Glycin ist ein geeignetes Pufferion. Die Pufferkonzentration liegt zwischen 10 und 100 mmol/l. Der pH-Wert liegt zwischen 2,5 und 8,5. Beispielsweise Natriumcitrat (20 mmol/l, pH 5.0) oder Tris/Borat (100 mmol/l, pH 8,5). Wahlweise wird ein Modifier, vorzugsweise ein chaotropes Agens, wie z.B. Harnstoff in molarer Konzentration zugesetzt. Die Aufgabe kann mittels UV- oder Fluoreszenzdetektion - nach vorheriger Derivatisierung - im Mikrokanal (1) verfolgt werden.

10 1.3. Die extrahierte Nukleinsäure wird im Kanal mit Hilfe der eingebrachten Membran unter Beibehaltung der Spannung immobilisiert und konzentriert (Fig. 2). Für Nukleinsäuren eignen sich zusätzlich zu den Größenausschlußmembranen auch weiche Anionenaustauscher beispielsweise auf Aminbasis. Vorzugsweise handelt es sich um Alkylamin-, Imidazol- oder Pyrrolidon- substituierte Polymere. Die Nukleinsäuren können auch durch Adsorption an Membranen retardiert werden. Beispielsweise enthalten die Membranen Nanopartikel, vorzugsweise Silica-basierend oder Metalloxidpigmente. Mit immobilisierten Oligonukleotiden werden spezifische Nukleinsäurestränge durch Festphasenhybridisierung immobilisiert.

20 25 1.4. Die auf wenige Nanoliter konzentrierte Nukleinsäure kann vielfältig modifiziert und analysiert werden (Fig. 3). Das offene Kanalsystem erlaubt die Zuführung und Abführung von Reagenzien mittels Druck oder Spannung. Die Polarität der Spannung wird wie bei der Extraktion und Fokussierung beibehalten. Kombiniert mit einer geeigneten Temperaturregelung sind in dem Mikrosystem enzymatische Spaltungen, Sanger-Sequenzierungen, Gensonden-Hybridisierung, aber auch PCR-Reaktionen möglich.

Beispielsweise kann die Nukleinsäure mit interkalierenden Farbstoffen markiert werden. Vorzugsweise handelt es sich um fluoreszierende Derivate, wie Ethidiumbromid, Acridinorange, bzw. deren Dimeren wie 1,1'-(4,4,7,7-Tetramethyl-4,7diazundecamethylen)-bis-4-[3-methyl-2,3-dihydromethyl-(benzo-1,3-oxazol)-2methylen]-chinolinium Tetraiodid (YOYO). Die Wahl des Farbstoffes richtet sich in erster Linie nach der gewählten Detektionseinheit. YOYO ist beispielsweise ideal für die Fluoreszenzdetektion nach Anregung mit einem Argon-Laser, während das entsprechende YOPRO-Dimer ideal zum Infrarot-Laser paßt. Diese Farbstoffe zeichnen sich auch dadurch aus, daß kaum Hintergrundfluoreszenz auftritt, da diese Farbstoffe nur im interkalierten Zustand fluoreszieren. Das positiv geladene YOYO kann beispielsweise vom Reaktionsgefäß (9), unter Beischaltung der Fokussierspannung, elektrokinetisch eingeführt werden.

Deutlich höhere Spezifität kann beispielsweise durch eine fluoreszenzmarkierte Gensonde erreicht werden. Die Gensonde besteht aus einer zur Ziehnukleinsäure komplementären Nukleotidsequenz die eine oder mehrere Fluoreszenzfarbstoffe trägt. Die Wahl des Farbstoffes richtet sich in erster Linie nach der gewählten Detektionseinheit. Fluorescein-isothiocyanat oder reaktive Cumarinderivate werden vorzugsweise für die Fluoreszenzdetektion nach Anregung mit einem Argon-Laser eingesetzt.

Enzymkatalysierte Reaktionen wie Restriktionsenzymverdau, PCR-Reaktion und Sanger Sequenzierung werden durchgeführt indem die erforderlichen Enzyme und benötigten Substrate zur Nukleinsäure im Mikrokanal transportiert werden.

- 1.5. Die konzentrierte Nukleinsäure kann in einem geeigneten Puffer durch Anlegen von Druck und/oder Spannung in wenigen Nanoliter eluiert werden und steht für weitere Analysen zur Verfügung.

Die Spannung wird dazu umgepolt, so daß nun die Anode im Analysegefäß (14) (Fig. 5) liegt. Vorzugsweise wird der Mikrokanal und das Puffergefäß (11) vorher mit einem wäßrigen Puffer der oben genannten Zusammensetzung gefüllt. Als nachfolgende Analysen können PCR-Reaktion, CE-Trennungen, DNA-Sequenzierungen, Hybridisierungsreaktionen massenspektrometrische Analysen oder molekularbiologische Verfahren durchgeführt werden.

- 1.6. Innerhalb des Mikrosystems ist die Nukleinsäure elektrophoretisch analysierbar (Fig. 4). Wie bei der Elution wird das Puffergefäß (10) dabei auf anodisches Potential gebracht. In einem geeigneten Siebmedium können Nukleinsäure-Fragmente größenabhängig getrennt werden.

Die Puffergefäße (10,11) sowie der Mikrokanal (1) werden dazu mit einer polymerhaltigen Pufferlösung gefüllt. Vorzugsweise handelt es sich dabei um lineare lösliche Polymere zum Beispiel Acrylamid, Polyvinylalkohol, Zellulose (modifiziert und unmodifiziert), Dextran, oder Agarose. Die sonstige Pufferzusammensetzung entspricht der allgemeinen Zusammensetzung.

- 1.7. Durch Verwendung fluoreszenzmarkierter Sonden, fluoreszenzmarkierter Terminatoren in der Sanger-Sequenzierung oder interkalierender Farbstoffe ist eine direkte Fluoreszenzdetektion der Nukleinsäure im Mikrosystem möglich.

2. Viren

- 2.1. Die virushaltige Probe wird auf einen solchen pH-Wert gebracht, daß das zu untersuchende Virus, oder die zu untersuchenden Viren, eine negative Überschlußladung trägt. Falls erforderlich können vorher Nukleaseverdaus oder Virusmodifikationen durchgeführt werden.

Die geeigneten Puffer sind bereits im allgemeinen Verfahren beschrieben worden. Der pH-Wert des Puffers muß deutlich über dem pK-Wert des Virus liegen. Auf saure Puffer wie Natriumcitrat wird daher verzichtet, ebenso finden Modifizierungsreagenzien keine Anwendung. Nukleaseverdaus werden vorzugsweise durch Zugabe von RNAsen oder DNAsen durchgeführt. Hervorragend geeignet ist beispielsweise die Benzonase. Modifizierungsreaktionen können in Form von Anfärbungsreaktionen mit interkalierenden Farbstoffen (vgl. 1.4) oder durch Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchgeführt werden. Die Wahl des Farbstoffes richtet sich in beiden Fällen nach der gewählten Detektionsart.

- 2.2. Die negativ geladenen Viren werden aus dieser gepufferten Lösung elektrophoretisch extrahiert. Dazu wird in die Lösung eine Elektrode gebracht und auf kationisches Potential gebracht. Die Elektrode im Puffergefäß (4) (Fig. 1) wird auf anodisches Potential gebracht und der Mikrokanal (4) wird mit einer elektrisch leitenden Flüssigkeit gefüllt. Die Zusammensetzung des Elektrolyts entspricht der allgemeinen Pufferzusammensetzung. Die Aufgabe kann mittels UV oder Fluoreszenz verfolgt werden. Während der Injektion kann zusätzlich eine Druckdifferenz zwischen den Puffergefäßen (3 und 4) angelegt werden.
- 2.3. Die extrahierten Viren werden im Kanal mit Hilfe der eingebrachten Membran immobilisiert und konzentriert (Fig. 2). Die Membran arbeitet nach dem Größenausschlußprinzip, wobei die Porengröße virusabhängig zwischen 10 und 200 nm liegt.
- 2.4. Die auf wenige Nanoliter konzentrierten Viren können vielfältig modifiziert und analysiert werden (Fig. 3). Das offene Kanalsystem erlaubt die Zuführung und Abführung von Reagenzien mittels Druck oder Spannung. Kombiniert mit einer geeigneten Temperaturregelung sind in dem Mikrosystem alle Derivatisierungsverfahren für Proteine und Nukleinsäuren möglich (vgl. 1.4 und 3.4). Die Viren können auch auf

der Membran lysiert und anschließend die Nukleinsäuren und/oder die Proteine analysiert werden (vgl. 1.4-1.7 und 3.4-3.7).

Die Größenausschlußmembran muß im Fall der Viruslyse so dimensioniert sein, daß die Zielproteine, bzw. Nukleinsäuren ebenfalls retardiert werden. Es ist prinzipiell jedes Lyseprotokoll geeignet. Vorzugsweise finden denaturierende Bedingungen wie extreme pH-Werte, chaotrope Reagenzien oder Detergenzien Anwendung. Beispiele sind verd. Natronlauge, Guanidinium-Hydrochlorid oder Natriumdodecylsulfat (SDS). Durch Verwendung nichtionischer Detergenzien (z.B. NP-40) kann von behüllten Viren die Lipoproteinmembran entfernt werden.

- 2.5. Die konzentrierten Viren können in einem geeigneten Puffer durch Anlegen von Druck und/oder Spannung in wenigen Nanoliter eluiert werden und stehen für weitere Analysen zur Verfügung.

Die Spannung wird dazu umgepolt, so daß nun die Anode im Analysengefäß (14) (Fig. 5) liegt. Vorzugsweise wird der Mikrokanal (1) und das Puffergefäß (11) vorher mit einem wäßrigen Puffer der oben genannten Zusammensetzung gefüllt. Nach Fraktionierung in ein puffergefülltes Analysengefäß (14) können mit den Viren beispielsweise Pathogenitätsassays oder CE-Trennungen durchgeführt werden. Nach Fraktionierung auf ein planares Analysentarget (14) können die Viren beispielsweise direkt elektronenmikroskopisch untersucht werden.

- 2.6. Innerhalb des Mikrosystems sind die Viren elektrophoretisch analysierbar. Wie bei der Elution wird das Puffergefäß (10) dabei auf anodisches Potential gebracht (Fig. 4).

- 2.7. Durch Verwendung fluoreszenzmarkierender Verfahren für Proteine oder Nukleinsäuren (vgl. 1.4 und 3.4) können die Viren auch fluoreszenzspektroskopisch identifiziert werden.

3. Proteine

- 5 3.1. Die proteinhaltige Probe wird auf einen pH-Wert gebracht der mindestens eine log-Stufe neben dem pK-Wert des Proteins liegt. Wenn es die Löslichkeitseigenschaften des Proteins erlauben, wird der pH-Wert unterhalb des pK-Werts des Proteins gelegt, so daß das Protein positiv geladen vorliegt. Im folgenden soll dieser Fall durchdiskutiert werden.
- 10 Für negativ geladene Proteine kehren sich die Spannungsverhältnisse entsprechend um. Geeignete Puffer entsprechen den allgemeinen Bedingungen. Vorzugsweise finden alkaligepufferte Phosphat- und Citratpuffer Anwendung, z.B. Natriumcitrat, 20 mmol/l, pH 2,5.
- 15 3.2. Die positiv geladenen Proteine werden aus dieser gepufferten Lösung elektrophoretisch extrahiert. Dazu wird in die Lösung eine Elektrode gebracht und auf anionisches Potential gebracht. Die Elektrode im Puffergefäß (4) (Fig. 1) wird auf kathodisches Potential gebracht und der Mikrokanal (4) wird mit dem Puffer gefüllt. Die Zusammensetzung
- 20 des Elektrolyts richtet sich nach der Art der Immobilisierungstechnik und entspricht den allgemeinen Bedingungen. Wahlweise wird ein Modifizier, vorzugsweise ein organisches Lösungsmittel, wie z.B. Methanol zwischen 5 und 30 % zugesetzt. Die Aufgabe kann mittels UV- oder Fluoreszenzdetektion - nach vorheriger Derivatisierung - im Mikro-
- 25 kanal (1) verfolgt werden.
- 30 3.3. Die extrahierten Proteine werden im Kanal mit Hilfe der eingebrachten Membran immobilisiert und konzentriert (Fig. 2). Neben den Größenausschlußmembran eignen sich für Proteine auch Ionenaustauschermembranen. Für negativ geladene Proteine finden als weiche Anionenaustauscher vorzugsweise DEAE-Phasen Anwendung. Als starke Anionenaustauscher finden hauptsächlich quartäre Ammoniumphasen

Verwendung. In dem hier diskutierten Fall der kationischen Proteine eignen sich als weiche Austauscher hauptsächlich Carbonsäure-Phasen und als starke Austauscher Sulfonsäurephasen. Für spezielle Proteine können die Membranen mit entsprechenden Antikörpern belegt werden und so über Affinität angereichert werden.

- 3.4. Die auf wenige Nanoliter konzentrierten Proteine können vielfältig modifiziert und analysiert werden (Fig. 3). Das offene Kanalsystem erlaubt die Zuführung und Abführung von Reagenzien mittels Druck oder Spannung. Die Polarität der Spannung wird wie bei der Extraktion und Fokussierung beibehalten. Kombiniert mit einer geeigneten Temperaturregelung sind in dem Mikrosystem enzymatische Spaltungen, Komplektierungen, chemische Derivatisierungen oder Antikörperbindungen möglich.

Beispielsweise kann das Protein mit Reaktivfarbstoffen umgesetzt werden. Vorzugsweise handelt es sich um aminspezifische Farbstoffe wie z.B. Fluoresceinisothiocyanat (FITC). Die Wahl des Farbstoffes richtet sich in erster Linie nach der gewählten Detektionseinheit. FITC ist beispielsweise ideal für die Fluoreszenzdetektion nach Anregung mit einem Argon-Laser.

Deutlich höhere Spezifität kann beispielsweise durch fluoreszenzmarkierten Antikörpern erreicht werden. Bei der anschließenden Trennung wird dann der Protein-Antikörper-Komplex mittels Fluoreszenz bestimmt.

- 3.5. Die konzentrierten Proteine können in einem geeigneten Puffer durch Anlegen von Druck und/oder Spannung in wenigen Nanolitern eluiert werden und stehen für weitere Analysen zur Verfügung.

Die Spannung wird dazu umgepolt, so daß nun die Kathode im Analysengefäß (14) (Fig. 5) liegt. Vorzugsweise wird der Mikrokanal und

das Puffergefäß (11) vorher mit einem wäßrigen Puffer der oben genannten Zusammensetzung gefüllt. Als nachfolgende Analysen können CE-Trennungen, massenspektrometrische Analysen, Enzymassays, Bindungsstudien oder immunologische Verfahren durchgeführt werden.

3.6. Innerhalb des Mikrosystems sind die Proteine elektrophoretisch analysierbar (Fig. 4).

3.7. Durch Verwendung fluoreszenzmarkierter Antikörper, fluoreszierender Enzymsubstrate, fluoreszierender Bindungspartner oder Derivatisierungsreagenzien können die Proteine auch fluoreszenzspektroskopisch identifiziert werden.

4. Bakterien

4.1. Die bakterienhaltige Probe wird auf einen solchen pH-Wert gebracht, daß das zu untersuchende Bakterium eine negative Überschußladung trägt. Falls erforderlich können vorher Nukleaseverdaus oder Proteinmodifikationen durchgeführt werden.

Die geeigneten Puffer sind bereits im allgemeinen Verfahren beschrieben worden. Der pH-Wert des Puffers muß deutlich über dem pK-Wert des Bakterium liegen. Auf saure Puffer wie Natriumcitrat wird daher verzichtet, ebenso finden Modifizierungsreagenzien keine Anwendung. Nukleaseverdaus werden vorzugsweise durch Zugabe von RNAsen oder DNAsen durchgeführt. Hervorragend geeignet ist beispielsweise die Benzonase. Modifizierungsreaktionen können in Form von Anfärbungsreaktionen mit interkalierenden Farbstoffen (vgl. 1.4) oder durch Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchgeführt werden. Die Wahl des Farbstoffes richtet sich in beiden Fällen nach der gewählten Detektionsart.

4.2. Die negativ geladenen Bakterien werden aus dieser gepufferten Lösung elektrophoretisch extrahiert. Dazu wird in die Lösung eine Elektrode gebracht und auf kationisches Potential gebracht. Die Elektrode im Puffergefäß (4) (Fig. 1) wird auf anodisches Potential gebracht und der Mikrokanal (4) wird mit einer elektrisch leitenden Flüssigkeit gefüllt. Die Zusammensetzung des Elektrolyts richtet sich nach der Art der Immobilisierungstechnik. Die Aufgabe kann mittels UV oder Fluoreszenz verfolgt werden.

4.3. Die extrahierten Bakterien werden im Kanal mit Hilfe der eingebrachten Membran immobilisiert und konzentriert (Fig. 2). Die Membran arbeitet nach dem Größenausschlußprinzip (Ultrafiltrationsmembran) oder dem Ionenaustauscherprinzip (Anionenaustauscher). Vorzugsweise finden Membranen für die Sterilfiltration mit einer Ausschlußgröße von 0,1 - 0,45 µm Verwendung. Es können aber auch die gleichen Anionenaustauscher wie für die Proteine eingesetzt werden (vgl. 3.3.)

4.4. Die auf wenige Nanoliter konzentrierten Bakterien können beispielsweise auf der Membran lyophilisiert und anschließend die Proteine oder Nukleinsäuren vielfältig modifiziert und analysiert werden (Fig. 3). Das offene Kanalsystem erlaubt die Zuführung und Abführung von Reagenzien mittels Druck oder Spannung. Kombiniert mit einer geeigneten Temperaturregelung sind in dem Mikrosystem alle Derivatisierungsverfahren für Proteine und Nukleinsäuren möglich (vgl. 1.4 - 1.7 und 3.4 - 3.7).

Die Größenausschlußmembran muß im Fall der Bakterienlyse so dimensioniert sein, daß die Zielproteine, bzw. Nukleinsäuren ebenfalls retardiert werden. Es ist prinzipiell jedes Lyseprotokoll geeignet. Vorzugsweise finden denaturierende Bedingungen wie extreme pH-Werte, chaotrope Reagenzien oder Detergenzien Anwendung. Beispiele sind verd. Natronlauge, Guanidinium-Hydrochlorid, Harnstoff oder Natriumdodecylsulfat (SDS).

- 4.5. Die konzentrierten Bakterien können in einem geeigneten Puffer durch Anlegen von Druck und/oder Spannung in wenigen Nanoliter eluiert werden und stehen für weitere Analysen zur Verfügung.

Die Spannung wird dazu umgepolt, so daß nun die Anode im Analysengefäß (14) (Fig. 5) liegt. Vorzugsweise wird der Mikrokanal (1) und das Puffergefäß (11) vorher mit einem wäßrigen Puffer der oben genannten Zusammensetzung gefüllt. Nach Fraktionierung in ein puffergefülltes Analysengefäß (14) können mit den Bakterien beispielsweise Pathogenitätsassays oder elektrophysiologische Experimente durchgeführt werden. Nach Fraktionierung auf ein planares Analysentarget (14) können die Bakterien beispielsweise direkt licht- oder elektronenmikroskopisch untersucht werden, oder z.B. mikrobiologisch auf einer Agarplatte über Plaques identifiziert werden.

- 4.6. Innerhalb des Mikrosystems sind die Bakterien elektrophoretisch analysierbar (Fig. 4).

- 4.7. Durch Verwendung fluoreszenzmarkierter Antikörper oder fluoreszierender Bindungspartner können die Bakterien auch fluoreszenzspektroskopisch identifiziert werden.

Alle gängigen Verfahren der Makromolekül-Isolierung setzen die Prozessierung des gesamten Probenvolumens durch das Extraktionsmedium voraus. Die Handhabung großvolumiger Proben verhindert aber die Miniaturisierung die ihrerseits unbedingt nötig ist um die Analysengeschwindigkeit und die Sensitivität zu steigern. Durch die Kombination von direkter elektrophoretischer Extraktion mit einer Immobilisierungsmembran im Mikromaßstab ist es erstmals möglich große Probenvolumina direkt mit einer Nanoanalysetechnik zu kombinieren.

Gegenüber den etablierten Verfahren zeichnet sich das Verfahren vor allem durch die vereinfachte Isolierung und extreme Anreicherungsraten aus.

5 Wird die Probe elektrophoretisch oder mit Druck aus dem Mikrokanal eluiert, können anschließend weitere Nanoanalysenverfahren durchgeführt werden. Nach Verdünnung steht die isolierte Probe auch für konventionelle makroskopische Analysenverfahren zur Verfügung. Das Verfahren stellt dann ein sehr effizientes Probenvorbereitungs-

10 Durch die Aufkonzentrierung von Nukleinsäuren können in vielen Fällen zusätzliche Amplifikationsschritte vermieden werden. Das Verfahren kann damit beispielsweise die PCR ersetzen.

15 Das Verfahren kann auch als Aufschlußverfahren für Viren, Bakterien und andere Zellen eingesetzt werden. Beispielsweise wird Bakteriummaterial isoliert, anschließend wird das Bakterium im Mikrokanal aufgeschlossen und die freigesetzte Nukleinsäure derivatisiert und analysiert.

20 Das Verfahren kann vorteilhaft zur direkten Nukleinsäure-Sequenzierung für Diagnostik und Forschung eingesetzt werden. Im Falle menschlicher DNA ist hierbei eine Analyse auf erbliche genetische Defekte möglich, die durch Deletionen, Mutationen oder Translokationen hervorgerufen werden. Als mögliche Einsatzgebiete seien hier genannt: Cystische Fibrose, Down's Syndrom, Sichelzellanämie, Huntington's Chorea, Hämophilie A und B. Eine weitere Anwendung dieser Nukleinsäureanalytik liegt in der Tumordiagnostik sowie der allgemeinen Erkennung für genetische Prädispositionen für bestimmte Krankheiten. Hierbei ist die Analyse

25 von Tumorsuppressorgen und Oncogenen von besonderem Interesse.

Eine weitere Verwendung liegt in der Kombination mit Nukleinsäureamplifizierungsverfahren (wie z. B. PCR).

30 Das Verfahren kann auch zur direkten Gensondenanalytik von medikamentenresistenten Keimen oder zur Subklassifizierung eingesetzt werden.

Als Qualitätssicherungsmethode ermöglicht die Erfindung auch die Kontrolle von gentechnologisch hergestellten Produkten, bei denen Nukleinsäurefreiheit gewährleistet sein muß.

- 5 Die Untersuchung von intakten Viren, Bakterien oder deren Nukleinsäure oder deren Proteine kann für die Infektionsdiagnostik eingesetzt werden. Auch Nukleinsäuren oder Proteine von Pilzen oder Parasiten können für diese Zwecke analysiert werden. Als wichtigste virale Vertreter seien hier exemplarisch im Falle der Viren HIV 1u. 2, HTLV, HSV, CMV, HPV, Hepatitis A, B, C, D, E, F, G, VZV, Rotaviren, EBV und
- 10 Adenoviren genannt. Zu den wichtigsten bakteriellen Vertretern gehören unter anderen Chlamydien, Mycobakterien, Shigella, Campylobacter, Salmonellen, Neisserien, Staphylokokken, Streptokokken, Pneumokokken. Bei den Pilzen zählen zu den wichtigsten Pathogenen Candida, Aspergillus sowie Cryptococcus.
- 15 Ein weiteres Einsatzgebiet ist in der Sicherheitsüberwachung von biologischen Proben zu sehen. Die Bedeutung liegt hier z.B. bei der Überprüfung von Blutspenden sowie aller aus Blut hergestellter Produkte. Die Einsatzgebiete entsprechen weitgehend denen der Infektionsdiagnostik.
- 20 Dieses Verfahren erlaubt erstmals den direkten hochsensitiven Nachweis von intakten Viren. Dabei können beliebige, auch unbekannte Viren direkt gemessen werden. Dies hat sowohl für die Infektionsdiagnostik, als auch für die Sicherheit von Produkten aus biologischen Materialien enorme Bedeutung, da mit allen anderen Verfahren nur spezielle Viren individuell nachgewiesen werden können.
- 25 Die durch elektrokinetische Probenvorbereitung erhaltenen Proteine sind aufgrund ihrer Anreicherung und Aufreinigung einer anschließenden immundiagnostischen Analytik leichter zugänglich. Hierbei haben in Humandiagnostik verschiedene Proteine wie z. B. Transferrin, Fibrinogen, β -2 Microglobulin, hCG oder
- 30 Tumormarker (AFP, CEA, CA 15-3, CA 19-9) hohe diagnostische Relevanz.

Beispiele

Elektrokinetische Injektion von Nukleinsäure

- 5 Zur Überprüfung der elektrokinetischen Injektion von Nukleinsäure wurde Modell-DNA durch das Anlegen von Spannung in einen Mikrokanal injiziert und mittels UV vermessen. Das Experiment sollte zeigen, daß es möglich ist Nukleinsäure elektrokinetisch zu extrahieren.
- 10 Es wurde eine Verdünnungsreihe von pBr-DNA (Boehringer Mannheim) von 250 bis 1,25 mg/l hergestellt und im Probengefäß vorgelegt. Nach der Injektion wurde elektrophoretisch getrennt. Die Meßbedingungen befinden sich in Tabelle 1.
- 15 Trägt man die Peakflächen gegen die DNA-Konzentration auf, so zeigt sich eine Sättigung der Peakflächenzunahme für hohe DNA-Konzentrationen. Die injizierte DNA-Menge wird über 100 mg/l durch den elektrischen Strom und nicht durch die DNA-Konzentration limitiert. Damit konnte gezeigt werden, daß Nukleinsäure über einen weiten Konzentrationsbereich elektrokinetisch aus einer Lösung aufkonzentriert werden kann.

Tabelle 1: Meßparameter zur elektrokinetischen Nukleinsäure-Injektion.

Spannung:	-20 kV
Puffer:	Natriumcitrat (20 mmol/l, pH 5.0, Fluka)
Kapillare:	PVA-gecoatete Quarzkapillare, 50 µm Innendurchmesser, 64,5 cm Länge, 56 cm zum Detektor (Hewlett-Packard, Waldbronn)
Kapillarelektrophoresegerät:	³ HHPCE (Hewlett-Packard, Waldbronn)
Temperatur:	25°C
Detektion:	DAD 190-600nm, λ 260 \pm 8 nm
Injektion:	elektrokinetisch (20 sec x -10 kV)
Spülen der Kapillare vor der Injektion:	1. Wasser (1 min, 5 x 10 ⁴ Pa) 2. Puffer (3 min, 5 x 10 ⁴ Pa)

5

Wiederfindungsrate von Größenausschlußmembran

Zur Überprüfung der Retardierung von Nukleinsäure an einer Größenausschlußmembran wurde pBr-DNA elektrokinetisch in den Mikrokanal injiziert und anschließend elektrophoretisch im Kanal zur Anode mobilisiert. Zwischen dem Injektionsende des Kanals und der im Kanal vorhandenen Größenausschlußmembran befand sich ein UV-Detektor (vgl. Fig. 4). Die pBR-DNA (250 mg/l) wurde am Detektor vorbei elektrophoriert und die Elektrophorese wurde so lange fortgesetzt, daß die DNA den Kanal ohne Membran bereits verlassen hätte. Dann wurde die Spannung umgepolt und so die retardierte DNA wieder am Detektor vorbei bewegt. Die Meßparameter befinden sich in Tabelle 2.

10

15

Tabelle 2: Meßparameter zur elektrophoretischen Nukleinsäure-Wiederfindung von einer Größenausschlußmembran.

Spannung:	-10 kV für 10 min, dann + 10 kV für 10 min
Puffer:	Tris/Borat (100 mmol/l, pH 8,5)
Kapillare:	gecoatete Quarzkapillare, 75 µm Innendurchmesser, 34 cm Länge, 8,5 cm zum Detektor (Biorad, München)
Membran:	Nach 20 cm wurde die Kapillare getrennt und nach Einführung der Membran (memfil PCTE 10 nm von Membrapure) mit einem Teflonschrumpfschlauch wieder verbunden.
Kapillarelektrophoresegerät:	³ H)HPCE (Hewlett-Packard, Waldbronn)
Temperatur:	25°C
Detektion:	DAD 190-600 nm, λ 260 \pm 8 nm
Injektion:	elektrokinetisch (10 sec x -10 kV)
Spülen der Kapillare vor der Injektion:	1. Wasser (1 min, 5 x 10 ⁴ Pa) 2. Puffer (3 min, 5 x 10 ⁴ Pa)

5

Die elektrokinetisch injizierte DNA migrierte nach 1,7 min durch den UV-Detektor. Ohne Größenausschlußmembran würde die DNA nach 7 min den Kanal wieder verlassen. Die Elektrophorese wurde aber insgesamt 10 min fortgesetzt und dann die Spannung direkt umgepolt. Die retardierte DNA in der Kapillare wanderte wieder zurück durch den UV-Detektor. Nach 12,05 min konnte ein Signal detektiert werden, das exakt der Peakfläche der injizierten DNA entsprach. Das analoge Experiment mit 3-Nitrobenzolsulfonsäure zeigte, wie erwartet, nur den Injektionspeak und damit keine Retardierung an der Größenausschlußmembran.

10

15 In einem weiteren Experiment wurden drei aufeinanderfolgende Injektionen an Nukleinsäure durchgeführt und mit identischen Bedingungen analysiert. Das Elektropherogramm zeigte eindeutig die Aufkonzentrierung der drei Nukleinsäure-Injektionen in einem Signal. Die Peakflächen der drei Einzelinjektionen entsprachen exakt der Peakfläche der retardierten DNA. Damit wurde gezeigt, daß Makromoleküle an der

Membran im Mikrokanal elektrophoretisch immobilisiert und quantitativ remobilisiert werden können.

5 Nukleinsäure-Extraktion

Für die Nukleinsäure-Aufkonzentrierung ist es notwendig die vorhandene Nukleinsäure-Menge aus einer bestimmten Lösung möglichst quantitativ in den Mikrokanal zu überführen. Wenn die gesamte Nukleinsäure injiziert ist, dürfte bei einer 2. Injektion aus dem selben Probengefäß nur noch sehr wenig Nukleinsäure extrahierbar sein.

Um die DNA-Menge möglichst gering zu halten wurde die DNA mit dem interkalierenden Farbstoff YOYO (Molecular Probes) angefärbt und mit laserinduzierter Fluoreszenzdetektion (LIF) detektiert. Dazu wurde YOYO (0,4 mmol/l, in 76 µl TBE-Puffer) vorgelegt und mit 1-4 µl der pBr-DNA-Lösung (1 mg/l) versetzt und mindestens 30 min bei RT vor der Messung inkubiert. Die Meßparameter befinden sich in Tabelle 3.

Tabelle 3: Meßparameter zur elektrophoretischen Nukleinsäure-Extraktion

Spannung:	-10 kV für 10 min, dann + 10 kV für 10 min
Puffer:	Tris/Borat (100 mmol/l, pH 8,5)
Kapillare:	gecoatete Quarzkapillare, 75 µm Innendurchmesser, 57 cm Länge, 50 cm zum Detektor (Biorad, München)
Kapillarelektrophoresegerät:	PACE 5510 (Beckman, München)
Temperatur:	25°C
Detektion:	LIF (Argon) EX 488, EM 520 nm, Gain 100
Injektion:	2 x elektrokinetisch (60 min x -10 kV) aus 50 µl
Spülen der Kapillare vor der Injektion:	1. Wasser (1 min, 5×10^4 Pa) 2. Puffer (3 min, 5×10^4 Pa)

Die Detektionsprofile sahen so aus, daß nach ca. 10 min ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenz zu verzeichnen war, der rasch ein Plateau erreichte. Nach ca. 30 min fiel die Fluoreszenz wieder ab, verbunden mit einem allmählichen Anstieg des Stroms im Kanal. Die Höhe des Plateaus korrelierte mit der Menge an DNA. Bei der zweiten
5 Injektion war aus keiner Probe noch signifikante Fluoreszenz zu injizieren. Die Daten belegen die vollständige Extraktion der pBr-DNA bei der 1. Injektion. Aus dem Fluoreszenzverlauf schließen wir, daß die gesamte Nukleinsäure bereits nach 30 min vollständig injiziert war.

10 Diese Daten zeigen eindeutig, daß die gesamte Nukleinsäure eines Probenvolumens elektrokinetisch in einen Mikrokanal injiziert werden kann. In Kombination mit der Größenausschlußmembran sollte es möglich sein diese Nukleinsäure in wenigen Nanoliter aufzukonzentrieren und so nachweisbar zu machen.

15

Nukleinsäure-Aufkonzentrierung

Mit den Meßbedingungen von Tab. 2 wurde Nukleinsäure in den Mikrokanal mit eingebauter Membran injiziert. Dazu wurde pBr-DNA (2,5 mg/l, 50 µl) 25 min injiziert
20 und anschließend mit dem Trennpuffer fokussiert (Fig. 2). Bei dieser niedrigen Konzentration war die DNA direkt nicht nachweisbar. Nach 10 min wurde die Spannung umgepolt und die aufkonzentrierte DNA wanderte nach 12 min als intensiver Peak zurück durch den Detektor. Praktisch die gesamte DNA der 50 µl-Probe (0,1 mg) war in weniger als 50 nl (1 cm in der Kapillare) aufkonzentriert. Der Anreicherungsfaktor
25 lag damit bei Faktor 1000.

Derivatisierung auf der Membran

30 Zur Überprüfung der Derivatisierung von Nukleinsäure an einer Größenausschlußmembran wurde pBr-DNA wie bereits beschreiben elektrokinetisch injiziert und auf der Membran immobilisiert (Tab. 2). Nach der Immobilisierung wurde die Spannung aber nicht sofort umgekehrt, sondern das zur DNA auf der anderen Seite der Mem-

bran gelegene Puffergefäß wurde gegen eine Pufferlösung ersetzt, die kationischen interkalierenden Farbstoff enthielt (YOYO, 0,4 mmol/l, Molecular Probes). Die Spannung wurde für weitere 20 Minuten beibehalten, wobei der Farbstoff durch den Mikrokanal, und durch die Membran wanderte. Die DNA wurde also mit YOYO auf der Membran inkubiert. Danach wurde nochmals 10 min ohne Farbstoff elektrophoriert, um restliches YOYO wieder aus der Kapillare zu entfernen. Dann wurde die Spannung umgepolt und so die retardierte und angefärbte DNA wieder am Detektor vorbei bewegt.

Die elektrokinetisch injizierte DNA migrierte nach 2 min durch den UV-Detektor. Zwei Minuten nach der Umpolung konnte ein Signal mit größerer Peakfläche detektiert werden, das der angefärbten DNA entsprach. Die mittels Dioden-Array-Detektion (DAD) im Mikrokanal erzeugte UV-VIS-Spektrum der injizierten DNA zeigte das typische UV-Spektrum mit 2 Absorptionsmaxima bei 200 und 260 nm. Nach der Inkubation mit YOYO auf der Membran wies die DNA zusätzlich ein Absorptionsmaximum bei 490 nm auf. Dies entspricht exakt dem Absorptionsmaximum der mit YOYO interkalierten DNA. Damit konnte bewiesen werden, daß Makromoleküle im Mikrokanal derivatisiert werden können.

Kopplung mit Elektronenmikroskopie

Als Beweis der weiteren Analyse von aufbereiteten Makromolekülen, soll die Kopplung mit der Elektronenmikroskopie (EM) dienen.

Herpes Simplex Viren (Typ 2) wurden mit YOYO (Molecular Probes) angefärbt und mit laserinduzierter Fluoreszenzdetektion (LIF) detektiert. Dazu wurde YOYO (0,4 mmol/l, in 76 µl TBE-Puffer) vorgelegt und mit 4 µl der HSV-2-Lösung (5×10^5 Viren/ml) versetzt und mindestens 30 min bei RT vor der Messung inkubiert. Die Meßparameter befinden sich in Tabelle 3.

Die wenigen injizierten, interkalierten Viren (10 - 20) wurden als einzelne Signale detektiert. Zur Identifizierung der Signale wurde die gleiche Probe unter vergleich-

baren Elektrophoresebedingungen an einer Prince-CE (Lauerlabs) mit Nanofraktions-
sampler (Probot, BAI-Instruments) analysiert. Das Ende des Mikrokanals wurde
dabei zeitgesteuert auf unterschiedliche Elektronenmikroskopieträger fraktioniert und
nach Negativkontrastierung mit Uranylacetat im EM untersucht.

5

In den erwarteten Fraktionen konnten intakte HSV-Partikel eindeutig nachgewiesen
werden. Damit wurde am Beispiel von Viren erstmals gezeigt, daß Makromoleküle
nach der elektrophoretischen Trennung für weitere Analysen als intakte Partikel zur
Verfügung stehen.

10

Legenden zu Abbildungen

Fig. 1: Schematische Darstellung der Aufreinigungsapparatur. Ein Mikrokanal
(1) mit eingebauter Membran (2) verbindet 2 Puffergefäße (3,4). Über
eingebrachte Elektroden können diese Puffergefäße auf unterschied-
liche Spannungspotentiale gebracht werden (5). Über eine Druckrege-
lung können auch unterschiedliche Drücke angelegt werden (6). In (3)
befindet sich die zu untersuchende Probe.

15

20

Fig. 2: Schematische Darstellung der Aufkonzentrierung. Das zu untersuchen-
de Makromolekül wurde elektrokinetisch in den Mikrokanal (1) mit
eingebauter Membran (2) injiziert. Das Probengefäß wurde bereits
durch den Konzentrationspuffer (7) ersetzt. Die Makromoleküle wan-
dern bis zur Membran und werden dort festgehalten.

25

Fig. 3: Schematische Darstellung der Probenmodifizierung. In den Reaktions-
gefäße (8,9) befinden sich die Derivatisierungsreagenzien, die entweder
elektrokinetisch und/oder mit Hilfe von Druck zu den aufkonzentrier-
ten Makromolekülen gebracht werden.

30

Fig. 4: Schematische Darstellung eines on-line Analysenverfahrens. Das
aufkonzentrierte und modifizierte Makromolekül wird elektrokinetisch

im Mikrokanal (1) an einem Detektorfenster (12) vorbei mobilisiert, so daß die spektroskopischen Eigenschaften analysiert und ausgewertet werden können (13).

5 Fig. 5: Schematische Darstellung der Fraktionierung des aufgereinigten Makromoleküls. Die aufkonzentrierte Probe wird in dem Probengefäß oder auf dem Analysentarget (14) aufgefangen und steht für weitergehende Analysen zur Verfügung.

10 Fig. 6: Schematische Darstellung der high-throughput Aufreinigungsapparatur. Eine Vielzahl von Mikrokanälen wird so angeordnet, daß sie mit dem Probenformat (z.B. Mikrotiterplatte) kompatibel sind. Die Membran (2) wird über das gesamte Format eingebracht und mit einem zweiten Mikrokanal-Array (15) verbunden. Die Vorgehensweise dieser
15 multiplen Anordnungen entspricht Fig. 1-5.

Fig. 7: Schematische Darstellung der Anreicherungsapparatur für schnelle Aufkonzentrierungen. Neben dem Mikrokanal (1) befindet sich ein Flachkanal (16), der mit dem Mikrokanal (1) über den Transferkanal (17) verbunden ist. Der Flachkanal erlaubt sehr viel höhere Flußraten und damit höhere Anreicherungsfaktoren. Details im Text.
20

Fig. 8: Schematische Darstellung der schnellen Anreicherung aus salzhaltiger Lösung in der Aufsicht am Beispiel von Nukleinsäuren. Die Anreicherung erfolgt durch Anlegen einer Spannung (6) an den Flachkanal (16) (Fig. 8a). Die Spannung wird so lange beibehalten, bis alle Nukleinsäuren an der Membranoberfläche (2) immobilisiert sind (Fig. 8b). Wird nun zwischen dem Flachkanal (16) und dem Mikrokanal (1), wie angegeben, eine Spannung (6) angelegt, so wandert die aufgereinigte und aufkonzentrierte Nukleinsäure von der großen Membranoberfläche des Flachkanals (16) zur Membran des Mikrokanals (1) (Fig. 8c) und steht dann für die analogen Verfahren (Fig. 3 -6) zur Verfügung. Details im Text.
25
30

Patentansprüche

1. Verfahren zur Isolierung und Aufkonzentrierung von Makromolekülen, dadurch gekennzeichnet, daß die Makromoleküle in einem Mikrokanal auf einer Membran elektrokinetisch gesammelt und anschließend analysiert werden.
5
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren, Viren, Proteine, Bakterien oder Pilze in einem Mikrokanal auf einer Membran elektrokinetisch gesammelt und anschließend analysiert werden.
10
3. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 und 2, wobei die Probe auf der Membran derivatisiert wird.
4. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 3 als Probenvorbereitung für weitere Analysenverfahren.
15
5. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 4 als Probenvorbereitung für MS, Gelelektrophorese, PCR, TEM, Nucleinsäuresequenzierung, Immundiagnostik und Hybridisierungen.
20
6. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens gemäß den Ansprüchen 1 bis 5 in Form eines Chip-Moduls mit eingebetteter Membran, wobei 1-400 Kapillaren nebeneinander angeordnet sind.
25
7. Vorrichtung gemäß Anspruch 2, enthaltend eine Membran aus Polyethersulfon (PES), Polyester, vliesgestütztem Acrylpolymer, Polytetrafluorethylen (PTFE), Polysulfon, Polypropylen (PP), Glasfaser, Nylon oder Polycarbonat.
8. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens gemäß den Ansprüchen 1 bis 7 in Form eines Flachkanals zur Analyse von salzhaltigen Proben.
30

9. Verwendung der Vorrichtung gemäß den Ansprüchen 6 bis 8 zur Anreicherung und zur Analyse von Makromolekülen.
10. Verwendung der Vorrichtung gemäß den Ansprüchen 6 bis 8 in der Qualitätskontrolle von biologischen Präparaten.
11. Verwendung der Vorrichtung gemäß den Ansprüchen 6 bis 8 zur direkten Infektionsdiagnostik.
12. Verwendung der Vorrichtung gemäß den Ansprüchen 6 bis 8 zur amplifikationsfreien Nukleinsäureanalytik.

Fig. 1

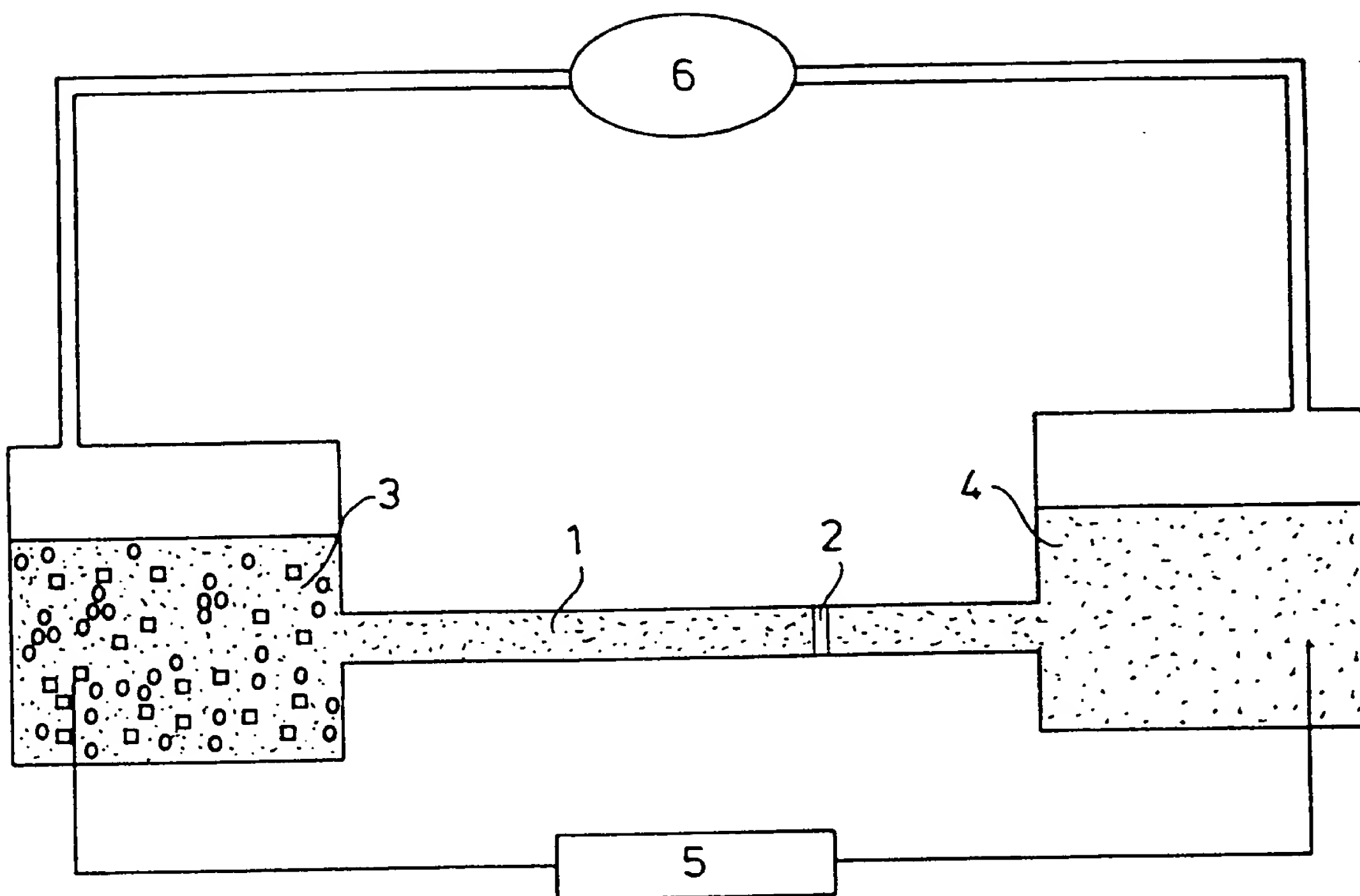


Fig. 2

2/5

09/341227

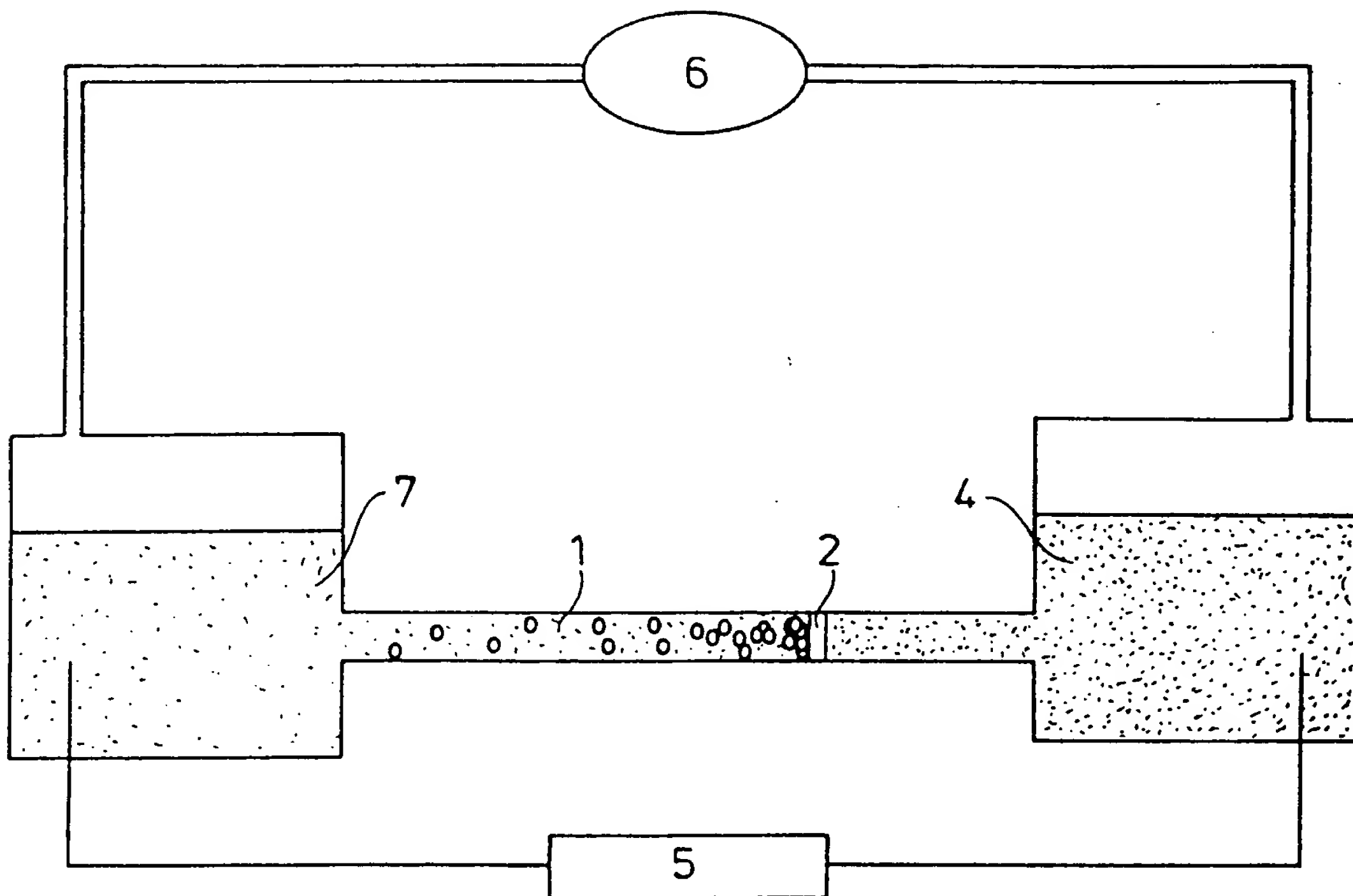


Fig. 3

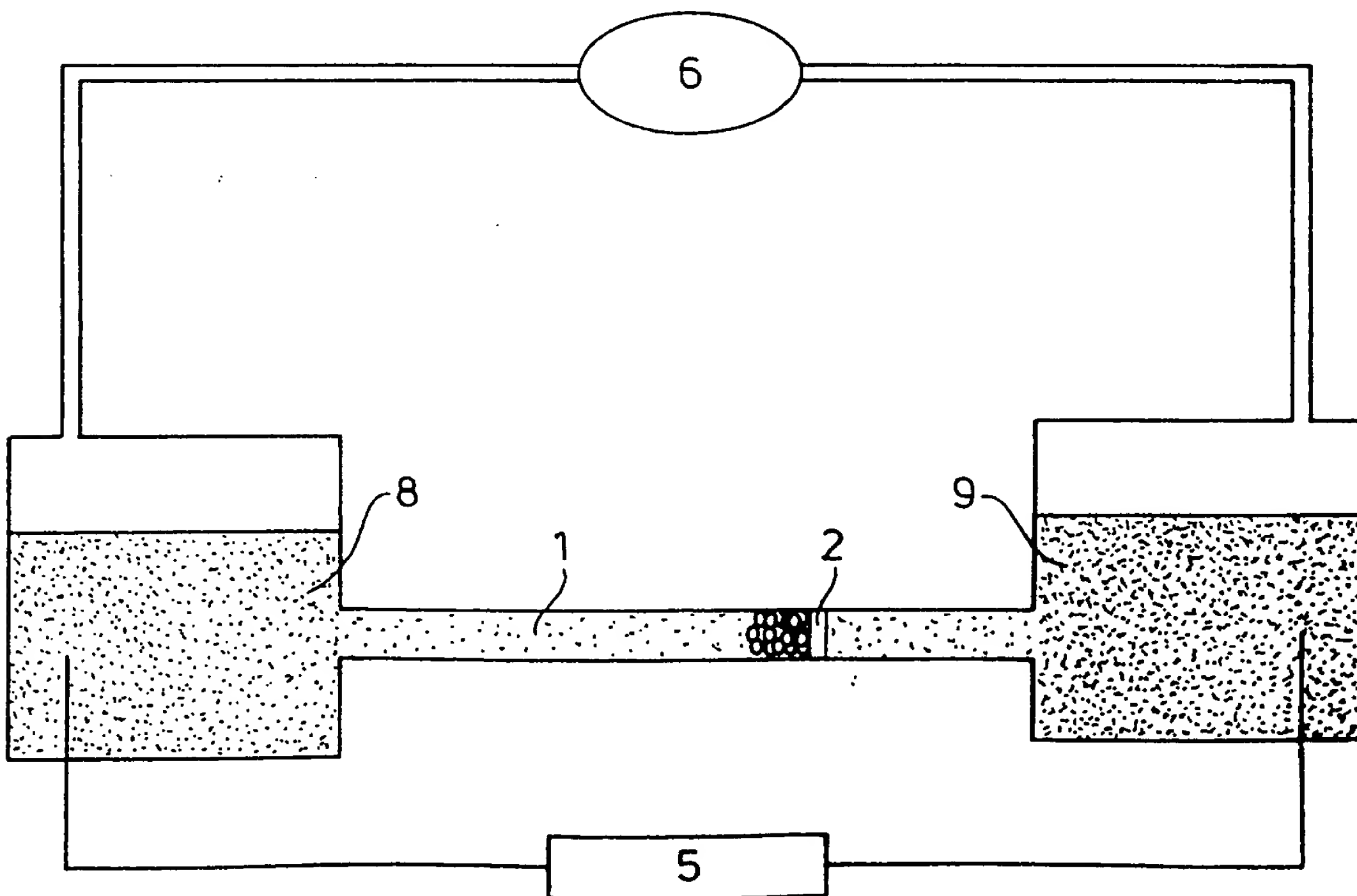


Fig. 4

3/5

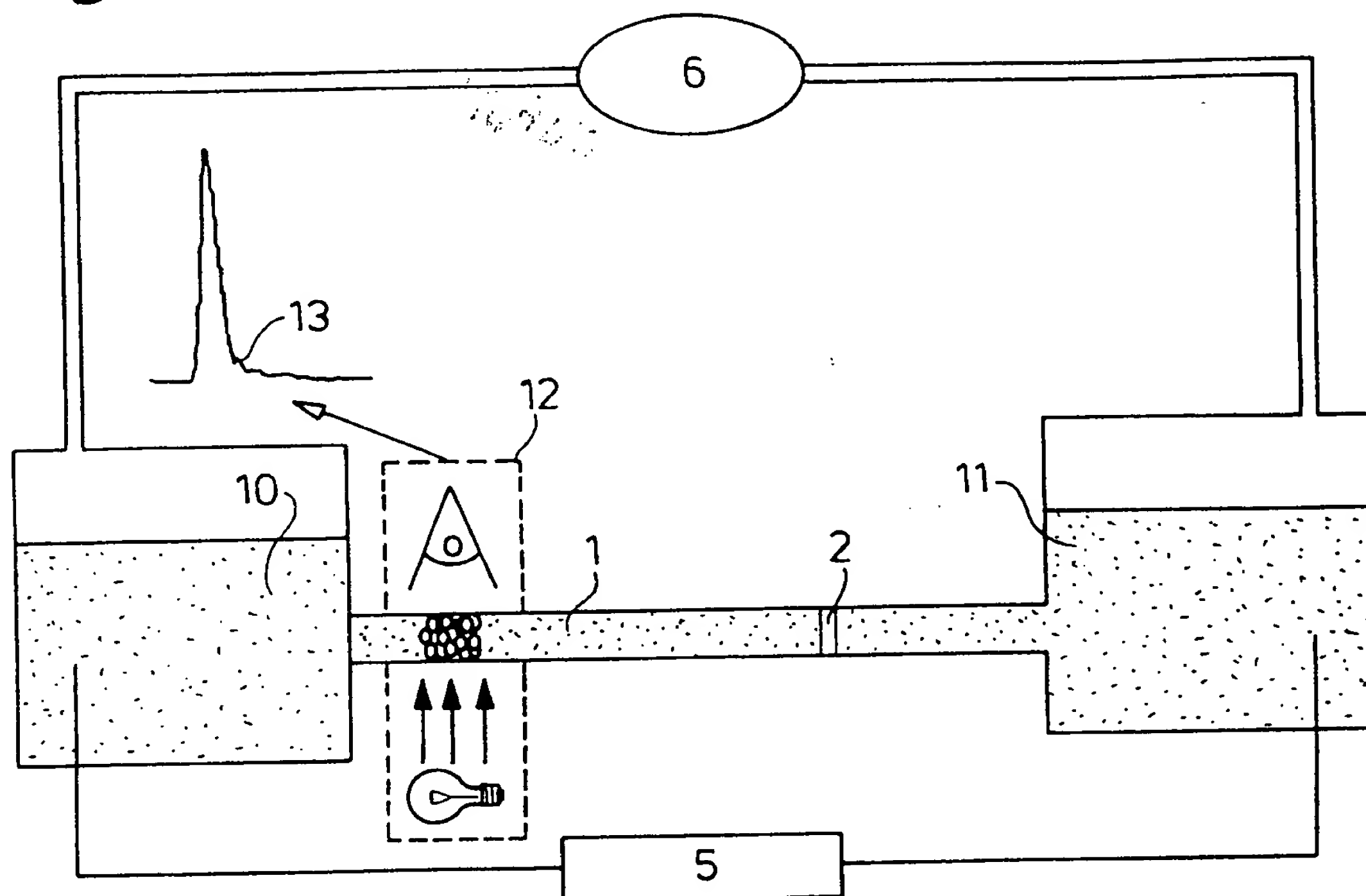


Fig. 5

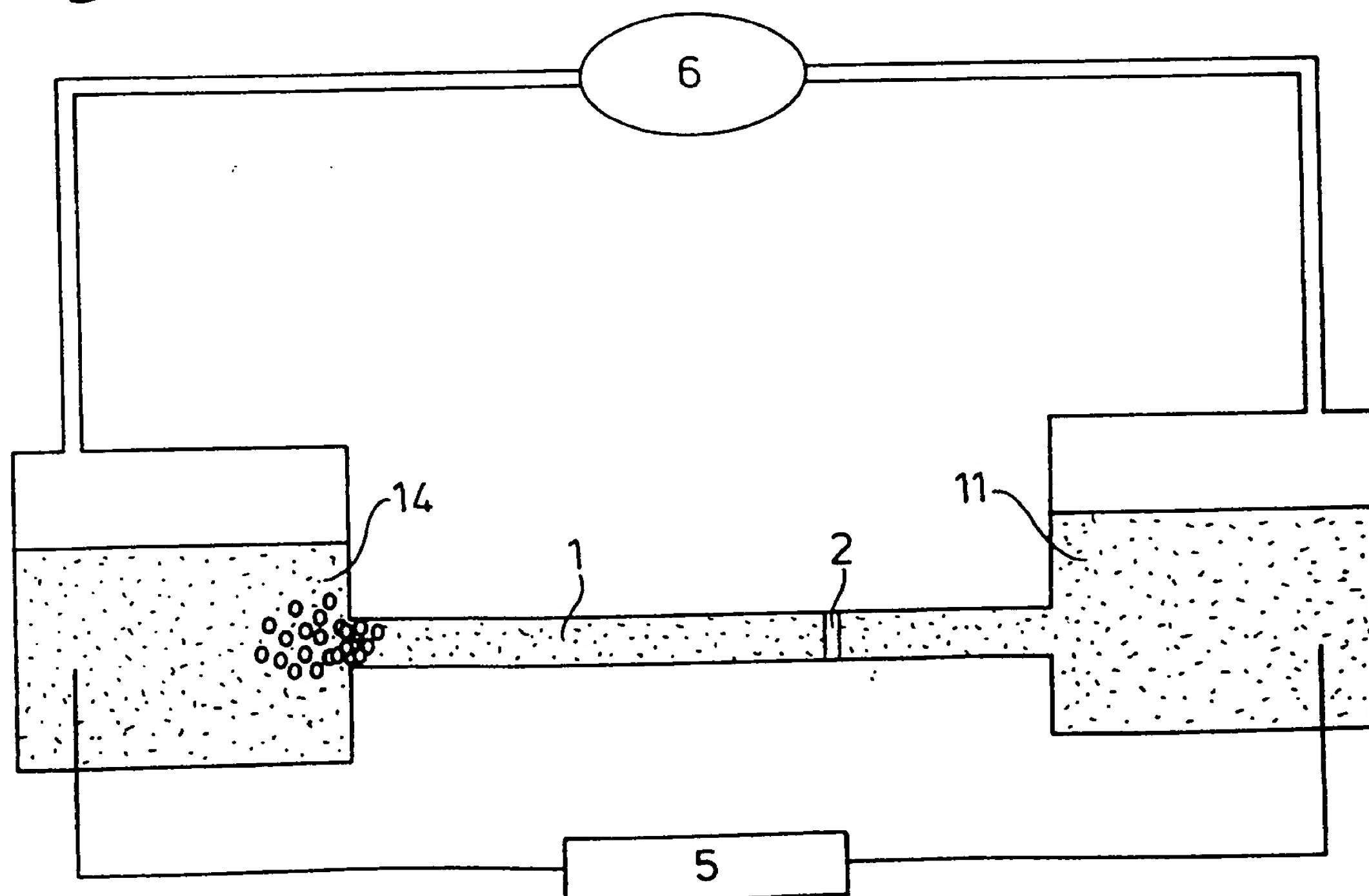


Fig. 6

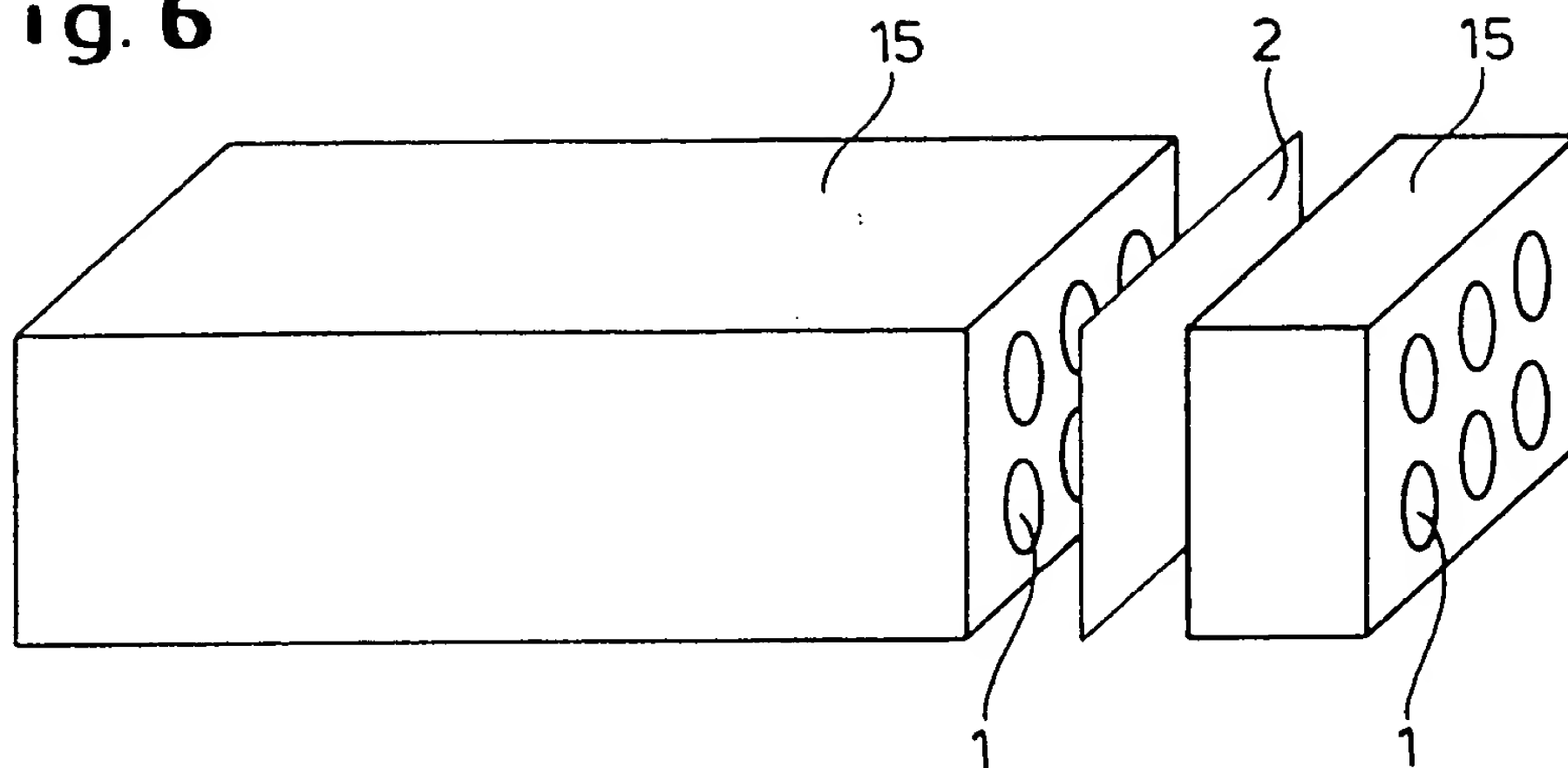


Fig. 7

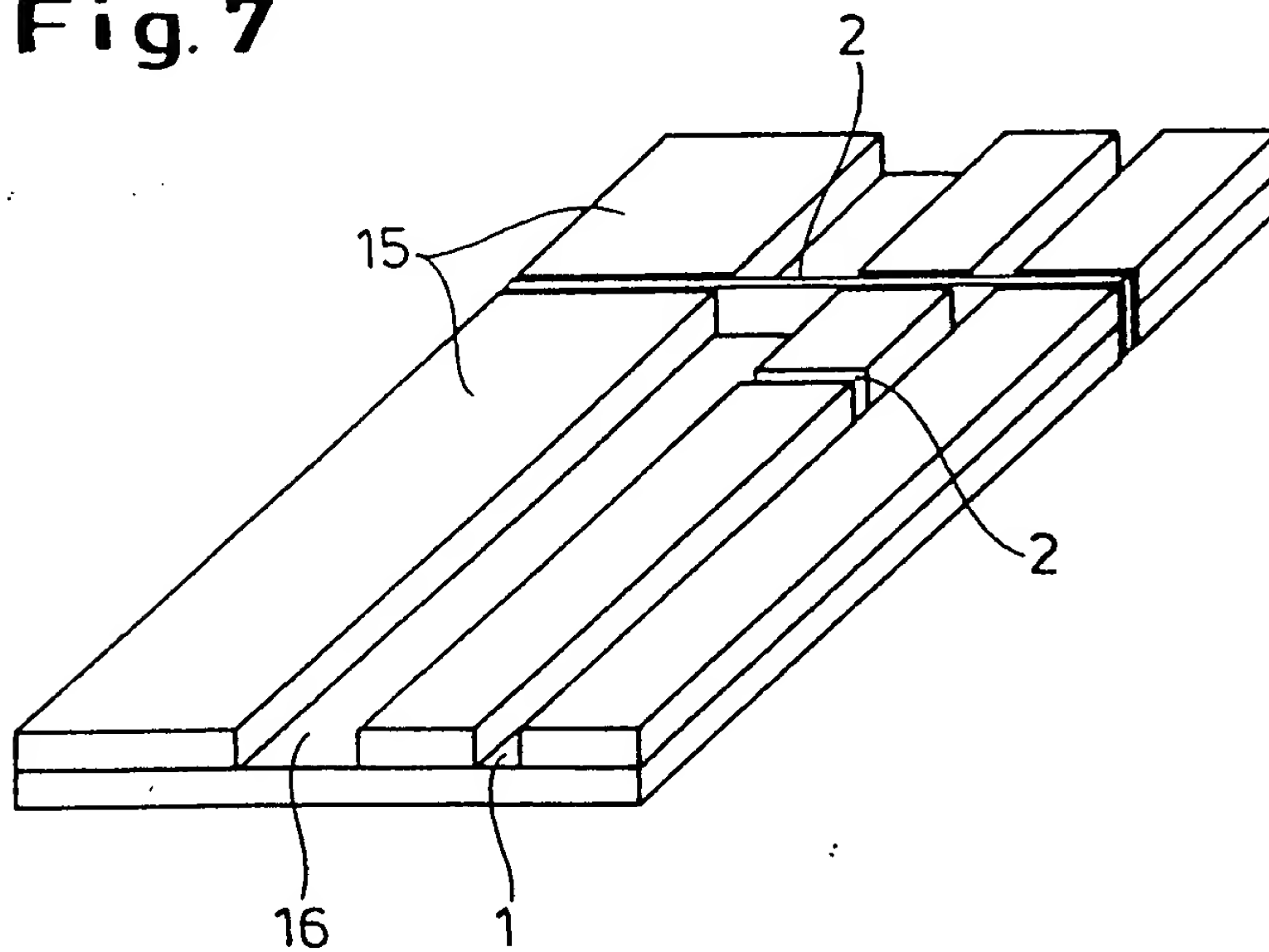
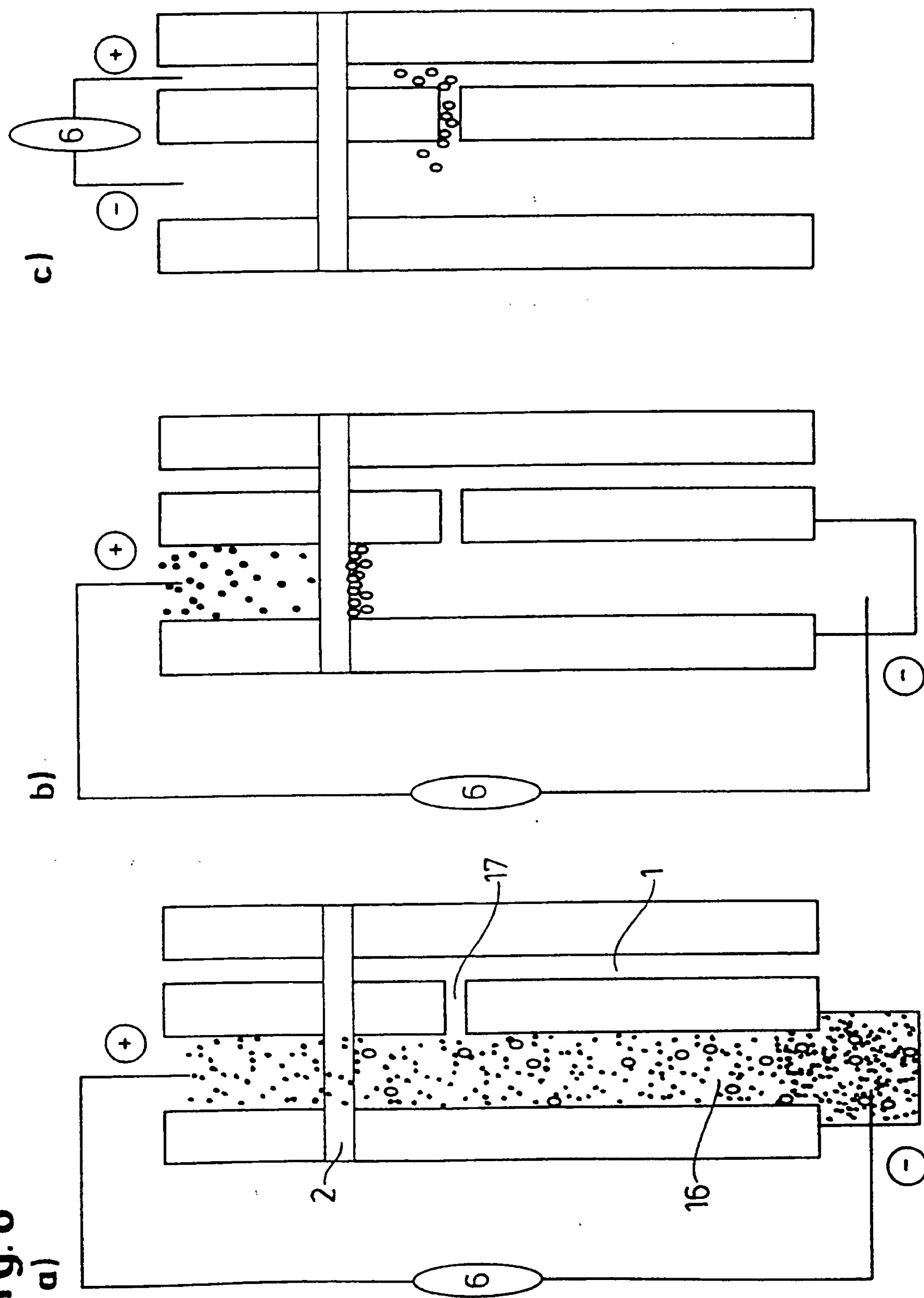


Fig. 8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

onal Application No

EP 97/07306

IFICATION OF SUBJECT MATTER
C07H1/08 G01N33/50

ional Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

searched (classification system followed by classification symbols)
G01N

er than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

uring the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

TO BE RELEVANT

Relevant to claim No.

with indication, where appropriate, of the relevant passages

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Citation of documents
Category

A (GUZMAN NORBERTO A) 18 March
application
it, in particular page 2
nd figure 31.

1,6

6

Y S. ET AL: "Protein
itro onto biomaterial
' with ULTI carbon"
DEVICES, ARTIF. ORGANS
187-203 CODEN: BMDOAI; ISSN:

02060277
ract.

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"S" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 April 1998

Date of mailing of the international search report

24/04/1998

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Riolo, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/07306

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9305390 A	18-03-93	US 5202010 A	13-04-93
		AU 661241 B	13-07-95
		AU 2640192 A	05-04-93
		CA 2120251 A	18-03-93
		EP 0666980 A	16-08-95
		MX 9204974 A	31-05-94

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07H1/08 G01N33/50

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07H G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 93 05390 A (GUZMAN NORBERTO A) 18.März 1993 in der Anmeldung erwähnt Ganzes Dokument; insbesondere Seite 2 Absatz 2 und Abbildung 31. ---	1,6
A	BOROVETZ, HARVEY S. ET AL: "Protein adsorption in vitro onto biomaterial surfaces covered with ULTI carbon" BIOMATER., MED. DEVICES, ARTIF. ORGANS (1982), 10(3), 187-203 CODEN: BMDOAI;ISSN: 0090-5488, 1982, XP002060277 siehe zusammenfassung.-----	6

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

7. April 1998

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

24/04/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Riolo, J